

Université de Montréal

**IDENTIFICATION D'UN NOUVEAU GÈNE SUPPRESSEUR DE TUMEURS
CANDIDAT (EphA10) DANS LES TUMEURS MAMMAIRES DES SOURIS
TRANSGÉNIQUES MMTV/*neu***

par

François Depault

**Programme de Biologie Moléculaire
Facultés des études supérieures**

**Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D)
en Biologie Moléculaire**

Août 2005

© François Depault 2005



QH

506

U54

2006

V. 020

07 00 00

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**IDENTIFICATION D'UN NOUVEAU GÈNE SUPPRESSEUR DE TUMEURS
CANDIDAT (EphA10) DANS LES TUMEURS MAMMAIRES DES SOURIS
TRANSGÉNIQUES MMTV/*neu***

**Dr Edouard Bradley
président-rapporteur**

**Dr Paul Jolicoeur
directeur de recherche**

**Dr Mario Chevrette
membre du jury**

**Dr Patricia Tonin
examineur externe**

SOMMAIRE

Les souris transgéniques MMTV/*neu* (erbB2) développent à des fréquences élevées, des tumeurs mammaires similaires à celles retrouvées chez l'humain. La longue période de latence (5-10 mois) nécessaire au développement des tumeurs suggère fortement que d'autres aberrations génétiques contribuent au phénotype tumoral. Le but premier de cette thèse est d'identifier grâce à la méthode LOH («Loss Of Heterozygosity»), de nouveaux gènes suppresseurs de tumeurs (GST) pouvant collaborer au développement des tumeurs MMTV/*neu*. Avant mon arrivée au laboratoire, une première analyse LOH a été effectuée sur le génome de 62 tumeurs mammaires MMTV/*neu* (Cool et Jolicoeur, 1999). Sur chacune des tumeurs, 86 marqueurs microsatellites répartis sur les 20 paires de chromosomes ont été analysés. Cette analyse démontre une fréquence de LOH élevée sur les chromosomes 4 (50%), 19 (32%) et 8 (21%). Ces chromosomes contiennent probablement plusieurs GST encore inconnus.

Dans cette thèse, nous avons réalisé une seconde analyse LOH concentrée sur les chromosomes 4 et 19 (Cool, Depault et Jolicoeur, article 1 de cette thèse). Le nombre de marqueurs analysé a été fortement augmenté sur les chromosomes 4 (de 6 à 36 marqueurs) et 19 (de 4 à 25 marqueurs). Cette analyse effectuée sur 93 tumeurs MMTV/*neu*, délimite 36 nouveaux loci LOH circonscrits : 22 sur le chromosome 4 (Naad4-6 à Naad4-27 ; Neu-associated allelic deletion) et 14 sur le chromosome 19 (Naad19-3 à Naad19-16). Plusieurs de ces loci sont courts (1-4 Mb) et certains le sont d'avantages (<1 Mb), ce qui facilitera grandement la recherche de nouveaux GST.

Finalement, nous avons sélectionné le locus LOH Naad4-13 (~ 800 kb) pour une recherche approfondie de nouveaux GST. Au cours d'une troisième analyse LOH, deux marqueurs microsatellites additionnels ont été étudiés à l'intérieur du locus Naad4-13 : D4Mit147 et D4Mit279. Ces marqueurs sont fréquemment délétés dans les 93 tumeurs mammaires analysées et permettent de subdiviser le locus Naad4-13 en deux loci LOH distincts : Naad4-13a (124 kpb) et Naad4-13b (283 kpb). Le chevauchement de ces loci a mené à l'identification d'un GST candidat unique: EphA10. Les séquences du gène EphA10 (~34 kb) contiennent à la fois le marqueur D4Mit147 (intron 5) et le marqueur D4Mit279 (intron 8). La perte spécifique de ces marqueurs dans les tumeurs MMTV/*neu*

semble correspondre à la perte du gène EphA10 (Depault, Cool, Hanna, Labrosse et Jolicoeur, article 2 de cette thèse).

Nous avons recherché des mutations dans les séquences du gène EphA10, en accord avec l'hypothèse de Knudson («two hit hypothesis»). Nous avons découvert des mutations dans l'intron 8 du gène EphA10, sur deux tumeurs du locus Naad4-13b. Ces mutations semblent avoir été provoquées par des événements de recombinaison impliquant le marqueur D4Mit279. Ces mutations modifient fortement les séquences introniques et pourraient affecter l'expression du gène suppresseur de tumeurs candidat EphA10.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons cloné la séquence complète du gène EphA10 (~ 34 kb) dans un cosmide, en aval du promoteur CMV. Par la suite, les mutations (intron 8) du gène EphA10 ont été réintroduites dans le cosmide CMV/EphA10^{WT} (Depault, Cool, Hanna, Labrosse et Jolicoeur, article 2). L'expression de ces constructions mutantes et de leurs contrôles est présentement à l'étude dans diverses lignées cellulaires (293T, HC11, Hs578T), en utilisant les techniques de Northern blot et de RT-PCR. Avec ce modèle, nous espérons démontrer l'implication du gène candidat EphA10 dans le développement des tumeurs mammaires MMTV/*neu*.

Mots clés: Cancer du sein, tumeur mammaire, MMTV/*neu*, gène suppresseur de tumeurs, LOH, EphA10, chromosome 4, chromosome 1p, recombinaison.

SUMMARY

The main objectives of this study are to identify and characterize new tumor suppressor genes (TSG) involved in the development of mammary tumors, induced by the activated erbB2 oncogene. A gene can be considered a TSG when its loss of expression or function favors tumor growth. According to the 2-hit Knudson's model, loss of heterozygosity (LOH) in a given genomic region of tumors is now generally interpreted as the loss of a TSG in this region. LOH is frequent in various human cancers, including in breast cancers. The identification of the putative TSG within these LOH regions has been very difficult and still represents a formidable task, explaining the low number of TSG known to date.

Using 62 (BALB/c X C57BL/6) F1 MMTV/erbB2-neu Tg mice which spontaneously develop mammary carcinoma, we have previously identified 9 specific LOH regions (Naad 1-9) (some showing up at very high frequency), distributed mainly on chromosomes 4, 8 and 19 (Cool and Jolicoeur, 1989). In this study, we screened 31 additional tumors (over the 62 already done and published) with additional microsatellite markers, concentrating our efforts on chr4 and 19, two regions syntenic to human chr 1p32-36 and 10q23-26, respectively. The 1p32-36 shows frequent LOH in human tumors, including breast tumors. We succeeded in defining several (36) additional restricted, non-contiguous LOH regions (some of them of ≤ 1 Mb) on these chromosomal regions (Cool, Depault and Jolicoeur, accepted for publication in *Genes, Chromosomes and Cancer*). This fine allelotyping has provided the most refine LOH analysis yet available to date for these regions in mouse or human chromosomes.

We further studied in more detail one region (Naad4-13) showing a very small LOH interval of ~ 800 kb. We were able to identify one candidate gene (EphA10) in this region which was mutated in two informative tumors. The mutation was in intron 8 and arose apparently by homologous recombination within microsatellite repeated sequences. We postulate that the microsatellite repeated sequences in intron 8 may represent a hot spot for homologous recombination and their recombination may represent a favored mechanism for mutating EphA10 (Depault, Cool, Hanna, Labrosse and Jolicoeur, In preparation). Mutations in introns have the potential to affect either splicing or levels of expression of

RNA. Mutations within CA repeats have been found to either suppress or enhance transcription, as well as to enhance or suppress splicing. It is therefore our hypothesis that the mutations identified in intron 8 of EphA10 affect the expression of the gene by one of these two mechanisms.

We have already cloned the 34 kp full-length EphA10^{wt} gene downstream of the CMV promoter in a cosmid vector. Expression of the gene was found to be adequate in 293T cells, allowing cloning of spliced variants. We have identified spliced transcripts, both in normal tissues and in transfected 293T cells. Two additional clones containing the intron 8 mutations have already been constructed by swapping the intron 8 mutant fragments in the full-length clone (Depault, Cool, Hanna, Labrosse and Jolicoeur, In preparation). Expression of these mutant EphA10 constructs will be compared to that of the full-length EphA10^{wt} gene by Northern blot analysis and RT-PCR. Three cell lines will be used, 293T cells and two mammary cell lines, the normal mouse HC11 cells and the Hs568T human breast tumor cells. This experiment should identify the consequences of the mutations within the intron 8 repeated sequences of EphA10 on its transcription. This information is obviously critical to choose the right strategy to recapitulate the effect of the mutations *in vivo*.

We are very happy to present evidence here on the identification of an excellent candidate TSG. The EphA10 gene is a member of one of the most interesting families of receptors involved in a lot of important biological processes, notably axon guidance and angiogenesis. We believe these findings to be especially important because EphA10 maps at the human syntenic region 1p32-34, a very frequent site of LOH in human tumors, including in breast tumors. In addition, our mapping of several other restricted LOH regions on chr4 and 19 opens the door to the identification of additional TSG in these regions, distinct from all those described so far.

Key words: Breast cancer, mammary tumors, MMTV/*neu*, LOH, tumor suppressor gene, EphA10, chromosome 4, chromosome 1p, recombination.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	III
SUMMARY.....	V
TABLE DES MATIÈRES	VII
LISTE DES TABLEAUX	X
LISTE DES FIGURES.....	XI
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	XIII
REMERCIEMENTS.....	XV
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	2
Avant-propos.....	2
1.1 Le cancer.....	3
1.1.1 Le cancer, une maladie génétique.....	4
1.2 Le cancer du sein.....	6
1.2.1 Anatomie du sein.....	6
1.2.2 Le carcinome canalaire.....	7
1.2.3 Détection des anomalies génétiques du cancer du sein	8
1.3 Les gènes suppresseurs de tumeurs.....	9
1.3.1 Découverte des gènes suppresseurs de tumeurs	10
1.3.1.1 Fusion des cellules somatiques	10
1.3.1.2 Études épidémiologiques du rétinoblastome.....	10
1.3.2 La détection des gènes suppresseurs de tumeurs	12
1.3.2.1 Les méthodes cytogénétiques	12
1.3.2.2 Les méthodes moléculaires ou LOH.....	13
1.3.3 La perte d'hétérozygoté	16
1.3.3.1 La recombinaison mitotique et la perte d'hétérozygoté	17
1.3.4 LOH dans les génomes tumoraux.....	19
1.3.4.1 LOH dans le cancer du sein	19
1.3.4.2 LOH sur le bras chromosomique 1p humain	20
1.3.4.3 LOH sur le chromosome 4 de souris.....	21
1.3.5 Les gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans le cancer du sein.....	22
1.3.5.1 Les gènes suppresseurs de tumeurs dans le cancer du sein sporadique	22
1.3.5.2 Les gènes suppresseurs de tumeurs dans le cancer du sein héréditaire	23
1.3.6 La classification des gènes suppresseurs de tumeurs.....	25
1.4 Les oncogènes	26
1.4.1 L'oncogène <i>neu</i> (p185/erbB2/HER2).....	26
1.4.2 Les modèles animaux du cancer du sein.....	27
1.4.2.1 Le virus MMTV.....	28
1.4.2.2 Exposition aux carcinogènes.....	28
1.4.2.3 Souris «knock-out» et transgéniques	28
1.4.2.3a Modèles avec inhibition de gènes suppresseurs de tumeurs.....	28
1.4.2.3b Modèles avec surexpression d'oncogènes.....	29
1.4.3 Les souris transgéniques MMTV/ <i>neu</i>	29
1.5 La famille des Ephrins.....	31
1.5.1 Les récepteurs Ephrins.....	31
1.5.2 Les ligands Ephrins	33
1.5.3 Les Ephrins et le cancer.....	34
1.5.4 Les Ephrins et le développement des glandes mammaires.....	35
1.5.5 Récepteurs Eph tronqués, sans domaine tyrosine kinase.....	36

CHAPITRE 2 ARTICLE 1	37
Avant-propos	38
ABSTRACT	39
INTRODUCTION	40
MATERIAL AND METHODS	42
RESULTS	44
DISCUSSION	48
ACKNOWLEDGEMENTS	51
REFERENCES	52
LEGENDS TO FIGURES	58
CHAPITRE 3 ARTICLE 2	68
Avant-propos	69
ABSTRACT	70
INTRODUCTION	71
MATERIALS AND METHODS	72
RESULTS	74
DISCUSSION	77
ACKNOWLEDGEMENTS	80
REFERENCES	81
LEGENDS TO FIGURES	88
CHAPITRE 4 Étude fonctionnelle du gène EphA10	95
4.1a Introduction	96
4.1b Matériel et méthodes	97
4.1c Légendes des figures	98
4.2 Le récepteur EphA10 provoquerait l'adhésion et la répulsion des cellules	99
4.3 Le gène EphA10 provoquerait la formation de syncytias	101
CHAPITRE 5 DISCUSSION GÉNÉRALE	105
5.1 La souris transgénique MMTV/neu (erbB2)	105
5.2 Identification d'un nouveau GST candidat dans les tumeurs MMTV/neu	106
5.2.1 Criblage du génome des tumeurs MMTV/neu	106
5.2.2 Criblage des chromosomes 4 et 19 des tumeurs MMTV/neu	107
5.2.3 Criblage du locus LOH Naad4-13 et identification du gène candidat EphA10	108
5.3 Recherche de mutations dans les séquences du gène candidat EphA10	111
5.3.1 Recherche de mutations dans les séquences <i>exoniques</i> du gène EphA10	111
5.3.2 Recherche de mutations dans les séquences <i>introniques</i> du gène EphA10	111
5.4 Mutation de l'intron 8 du gène EphA10 par recombinaison	113
5.5 La mutation de l'intron 8 pourrait modifier l'expression du gène EphA10	115

5.6 Modèle d'étude <i>in vitro</i> pour déterminer l'impact de la mutation de l'intron 8 sur l'expression du gène EphA10.....	116
5.6.1 Clonage du gène candidat EphA10	116
5.6.2 Réintroduction des mutations de l'intron 8 dans le gène EphA10.....	117
5.7 Surexpression du gène EphA10 (normal et muté) dans les cellules en culture	118
5.7.1 Expression du gène EphA10 normal	119
5.7.1.1 Identification de la forme tronquée du gène EphA10	119
5.8 Hypothèse concernant la forme tronquée et la mutation de l'intron 8 du gène EphA10	121
5.9 Réarrangements affectant le gène EPHA10 dans les tumeurs humaines	122
5.9.1 Surexpression du gène EPHA10 dans les lignées tumorales du sein.....	122
5.9.2 LOH au niveau du locus EPHA10 dans les tumeurs humaines	122
5.9.3 Mutation du gène EPHA10 dans les tumeurs humaines	123
CHAPITRE 6 EXPÉRIENCES FUTURES.....	106
6.1 Expériences <i>in vitro</i>	125
6.1.1a Étude de l'expression du gène EphA10 dans les tumeurs 35T et 41BT	125
6.1.1 Recherche de mutations dans le gène de souris EphA10.....	125
6.1.2 Recherche de mutations dans le gène humain EPHA10	125
6.1.3 Étude sur l'expression du gène EphA10 dans les glandes mammaires	126
6.1.4 Impact de la surexpression du gène EphA10 sur le phénotype des cellules	126
6.2 Expériences <i>in vivo</i>.....	126
6.2.1 Transplantation des cellules surexprimant EphA10 dans les souris nues	126
6.2.2 Création d'une souris transgénique MMTV/EphA10 ^{Mut}	127
6.2.3 Création d'une souris EphA10 «knock-out»	127
CHAPITRE 7 CONCLUSION.....	126
RÉFÉRENCES.....	131
ANNEXE 1a.....	151a
ANNEXE 1.....	151
ANNEXE 2.....	152
ANNEXE 3.....	155
ANNEXE 4.....	159
ANNEXE 5a.....	164a
ANNEXE 5.....	164
ANNEXE 6.....	165
CURRICULUM VITAE	167

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	LOH détectés sur le chromosome 4 dans différents modèles murins du cancer.....	21
Tableau II	Amorces pour l'amplification PCR des 17 exons du gène de souris EphA10.....	152
Tableau III	Amorces diverses pour l'amplification des gènes EphA10/EPHA10.....	153
Tableau IV	Amorces pour l'amplification PCR des exons du gène humain EPHA10.....	154

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Structure du sein chez la femme.....	7
Figure 1.2	Les différents stades du carcinome canalaire.....	7
Figure 1.3	Amplification PCR d'un marqueur microsatellite.....	14
Figure 1.4	Mécanismes pouvant causer un LOH.....	16
Figure 1.5	Recombinaison mitotique entre deux chromosomes homologues....	18
Figure 1.6	Les gènes suppresseurs de tumeurs «gatekeeper» et «caretaker»....	25
Figure 1.7	Structure des récepteurs de la famille Ephrin.....	32
Figure 1.8	Structure des ligands de la famille Ephrin.....	33
Figure 1.9	Mécanisme d'adhésion du récepteur EphA7.....	36
Figure 2.1	«LOH analysis».....	60
	(a) «Representative examples of LOH.».....	60
	(b) «LOH analysis of informative marker/tumor for two discrete and small LOH regions defined by a single informative marker.».....	61
Figure 2.2	«Deletion mapping of chromosome 4 in MMTV/neu Tg mammary tumors.».....	62
Figure 2.3	«Grouping of tumors with LOH in restricted regions of chromosome 4.».....	63
	(a) «LOH regions with tumors sharing the same LOH locus at each marker.».....	63
	(b) «LOH region is represented by a rectangle spanning the deleted area and delimited by heterozygous markers.».....	64
Figure 2.4	«Deletion mapping of chromosome 19 in MMTV/neu Tg mammary tumors.».....	65
Figure 2.5	«Grouping of tumors with LOH in restricted regions of chromosome 19.».....	66
	(a) «LOH regions with tumors sharing the same LOH locus at each marker.».....	66
	(b) «LOH region is represented by a rectangle spanning the deleted area and delimited by heterozygous markers.».....	67
Figure 3.1	«Structural organization of the Naad4-13 LOH region.».....	90

Figure 3.2	«LOH analysis within the Naad4-13 region.».....	91
Figure 3.3	«Identification of mutated EphA10 alleles in mammary tumors.» .	92
Figure 3.4	«RT-PCR analysis of EphA10 transcripts.».....	93
Figure 3.5	«Northern blot analysis of EphA10 expression.».....	94
Figure 4.1	Répulsion et adhésion des cellules 293T suite à la transfection transitoire du gène EphA10.....	100
Figure 4.2	Formation de syncytias dans les pétris de cellules transfectées de façon transitoire avec le cosmide CMV/EphA10 ^{WT}	102
Figure 4.3	La répulsion cellulaire médiée par les gènes Ephrins implique un phénomène de trans-endocytose.....	103
Figure 5.1	Perte des marqueurs microsatellites D4Mit147 et D4Mit279 dans les tumeurs MMTV/ <i>neu</i>	109
Figure 5.2	Patron LOH des loci Naad4-13 et MPA.....	110
Figure 5.3	Construction des clones CMV/EphA10 ^{Mut1} et EphA10 ^{Mut2} à partir du cosmide CMV/EphA10 ^{WT}	117
Figure 5.4	Séquences répétées de l'intron 8 du gène EphA10.....	121
Figure Annexe 1a	Analyse des patrons d'homozygosité sur le chromosome 4 des tumeurs MMTV/ <i>neu</i>	151b
Figures Annexe 1	1. Construction du transgène MMTV/ <i>neu</i> 2. Croisement des lignées MMTV/ <i>neu</i>	151 151
Figures Annexe 3	1. Recherche de réarrangements entre les marqueurs D4Mit147 et D4Mit279..... 2. Southern blot 1..... 3. Southern blot 2..... 4. Southern blot 3..... 5. Southern blot 4..... 6. Southern blot 5.....	155 156 156 157 157 158
Figures Annexe 4	1. Criblage de la librairie de BAC..... 2. Criblage PCR des 72 «superpool» d'ADN..... 3. Criblage PCR des 8 «plate pool» d'ADN..... 4. Hybridation de la membrane.....	159 160 161 162
Figure Annexe 5	Clonage du gène candidat EphA10.....	164
Figure Annexe 6	Réintroduction des mutations de l'intron 8 dans le gène EphA10 ^{WT}	165

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
BAC	<i>bacterial artificial chromosomes</i>
CA	cytosine, adenine
CCIS	carcinome canalaire <i>in situ</i>
cDNA	acide désoxyribonucléique complémentaire
Chr	chromosome
CGH	<i>comparative genome hybridization</i>
CMV	<i>cytomegalovirus</i>
DGGE	<i>denaturing gradient gel electrophoresis</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EST	<i>express sequence tag</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GST	gène suppresseur de tumeurs
HER-2	<i>human erbB2</i>
Kb	kilobases
LOH	<i>loss of heterozygosity</i>
LTR	<i>long terminal repeat</i>
Mb	megabases
MMTV	<i>mouse mammary tumor virus</i>
MSV	<i>murine sarcoma virus</i>
Neu	neuroblastome
nt	nucléotides
pb	paire de bases
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
QTL	<i>quantitative trait loci</i>
RT	<i>reverse transcriptase</i>
Tg	transgénique
TM	transmembranaire
TK	tyrosine kinase
Rb	rétinoblastome
YAC	<i>yeast artificial chromosomes</i>

Un livre savant reflète toujours une âme qui se voûte : tout métier force son homme à se voûter. Que l'on revoie les amis avec qui on a été jeune après qu'ils ont pris possession de leur science : hélas! c'est d'eux que, dès lors et pour toujours, la science a pris possession. Incrusté dans leur coin jusqu'à être méconnaissables, sans liberté, privés de leur équilibre, amaigris et anguleux partout, sauf à un seul endroit où ils sont bien ronds, l'on est ému et l'on se tait lorsqu'on les retrouve ainsi.

Friedrich Nietzsche

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier mon directeur de recherche, le Dr Paul Jolicoeur, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire de recherche. J'ai grandement apprécié et bénéficié de l'apprentissage de ce scientifique de renom. J'ai rarement rencontré un savant aussi passionné. J'ai beaucoup de respect pour le Dr Jolicoeur, je le considère comme mon mentor.

Je voudrais également remercier mon superviseur immédiat le Dr Marc Cool. J'ai énormément appris en côtoyant cette personne cultivée, d'une rigueur intellectuelle et d'une patience incroyable. Je suis particulièrement reconnaissant envers Benoit Laganière pour son appui technique. Il fut pour moi un modèle quant à son ardeur au travail et son dynamisme. Mes remerciements au Dr Zaher Hanna pour sa contribution à nos travaux. Un merci spécial à Isabelle Labrosse! Une pensée pour mes collègues étudiants Patrick Vincent et Xiuje Lee. Mes salutations aux membres de notre laboratoire : Isabelle, Marie-Chantale, Jean-René, Marie-Eve, Caroline, Stéphanie, Fernande, Soela, Ginette, Munir, Pavel, Johanne, Julie, Paul, Moha, Walter, Sandrine, Émilie, Jacynthe, Chunyan, Lin, Ezequiel, Mathieu, Tom, Helena, Viorica, Yaoping, Fatiha, Stéphane, Rita, Karina, Denis, Étienne, Arash, Rémi et les autres.

Merci aux membres de mon comité de suivi annuel : le Dr Daniel Sinnett, le Dr Mario Chevrette, le Dre Martine Raymond et le Dr Paul Jolicoeur. Je tiens à remercier l'Institut de Recherches Cliniques de Montréal et exprimer ma gratitude envers la directrice du Département de Biologie Moléculaire, le Dre Trang Hoang et sa secrétaire madame Vivianne Jodoin. J'aimerais également remercier madame Anne Haché, coordonnatrice aux affaires académiques de l'IRCM, pour sa générosité et sa patience. Pour terminer, je désirerais remercier sincèrement les correcteurs de cette thèse : le Dr Edouard Bradley, le Dr Patricia Tonin, le Dr Mario Chevrette et le Dr Paul Jolicoeur.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

Le cancer du sein et les gènes suppresseurs de tumeurs.

Avant-propos

L'introduction de cette thèse (**chapitre 1**) traite du cancer (1.1), notamment le cancer du sein (1.2). Nous allons ensuite nous attarder sur les gènes suppresseurs de tumeurs (1.3). Nous parlerons de leurs découvertes (1.3.1), des méthodes pour les détecter (1.3.2), de la perte d'hétérozygotie (1.3.3) dans les génomes tumoraux (1.3.4), des GST impliqués dans le cancer du sein (1.3.5) et de leurs classifications (1.3.6). Par la suite, nous allons survoler les oncogènes (1.4) pour se concentrer principalement sur l'oncogène *neu* (1.4.1) et de son expression dans les modèles animaux (1.4.2) comme la souris transgénique MMTV/*neu* (1.4.3). Finalement, nous allons introduire la famille des gènes Ephrins (1.5), et parler notamment du rôle des récepteurs (1.5.1) et des ligands (1.5.2) Ephrins dans le cancer (1.5.3) et dans le développement des glandes mammaires (1.5.4).

Cette thèse contient 6 autres chapitres. Avec l'autorisation du Dre Trang Hoang, directrice du programme de biologie moléculaire de l'université de Montréal, cette thèse est rédigée "par articles". Le premier article (**chapitre 2**) localise plusieurs loci LOH sur les chromosomes 4 et 19 des tumeurs mammaires MMTV/*neu*. Le second article (**chapitre 3**) présente le clonage d'un nouveau GST candidat (EphA10) sur le chromosome 4 des tumeurs MMTV/*neu*. Le **chapitre 4** rapporte certains résultats non publiés. La discussion (**chapitre 5**) reprend les principaux sujets abordés dans les deux articles et approfondit certains points importants. Le **chapitre 6** présente les expériences planifiées et la conclusion (**chapitre 7**) met en relief les apports de cette recherche et évoque certaines questions encore non élucidées.

1.1 Le cancer

Le cancer est la deuxième cause de mortalité en Amérique du Nord, juste après les maladies cardiovasculaires (INCC, 2004). Selon certaines estimations, 43 % des canadiens et 38 % des canadiennes souffriront d'un cancer au cours de leurs vies. De ce nombre, 28 % des hommes et 23 % des femmes en mourront. Les cancers de la prostate et du sein sont les plus diagnostiqués au pays, le cancer du poumon demeure le plus mortel. Au Canada, les taux d'incidence pour le cancer du poumon, du sein et de la prostate sont parmi les plus élevés au monde (INCC, 2004). L'existence d'un cancer est révélée par la présence d'une tumeur : il n'existe aucune méthode infaillible de diagnostic précoce du cancer.

Le nombre total de cellules est relativement stable chez l'adulte et ces cellules ont généralement perdu leur pouvoir de multiplication élevé observé durant l'embryogenèse. Toutefois, il arrive que certaines cellules de l'organisme (provenant en théorie, de n'importe quels tissus¹) retrouvent leur pouvoir de multiplication et démontrent une prolifération anormale et excessive pouvant donner naissance à une tumeur cancéreuse. Cette croissance anarchique de cellules malignes échappe aux mécanismes de régulation de l'organisme. La cellule maligne possède les propriétés suivantes (Hanahan et Weinberg, 2000) :

1. Immortelle, elle se soustrait à la mort cellulaire programmée et peut se diviser indéfiniment.
2. Transformée, elle croît sans attachement, sans inhibition de contact, sans sérum, adopte une morphologie particulière et perd la capacité de se différencier.
3. Métastatique, elle peut quitter le tissu d'origine et envahir d'autres tissus par dissémination hématogène ou lymphatique.

La multiplication désordonnée des cellules malignes d'un tissu provoquera la formation d'une masse anormale appelée tumeur (les descriptions suivantes concernent les tumeurs solides). Cette tumeur amorcera éventuellement une phase de croissance durant laquelle les

¹ Il existe plus d'une centaine de types de cancers et plusieurs sous-types de tumeurs (Hanahan et Weinberg, 2000).

cellules cancéreuses remplaceront progressivement les cellules du tissu d'origine. La tumeur augmentera progressivement de volume et exercera une pression physique sur les tissus adjacents. Cette pression stimulera chez la tumeur la sécrétion de protéases, provoquant la lyse des épithéliums et l'envahissement des tissus voisins (Jedinak et Maliar, 2005). Une tumeur infiltrante pourra former des métastases : des cellules malignes se détacheront de la tumeur, traverseront les membranes des capillaires sanguins et lymphatiques, circuleront dans l'organisme et coloniseront d'autres tissus. L'accroissement, l'envahissement et la propagation par métastases d'une tumeur provoqueront, la mort du malade. Hanahan et Weinberg (2000) résument les propriétés d'une tumeur en six points majeurs : 1) pouvoir de replication illimitée, 2) invasion et métastases, 3) autosuffisance en signaux de croissance, 4) insensibilité aux signaux anti-croissance, 5) évasion de l'apoptose et 6) induction de l'angiogenèse.

1.1.1 Le cancer, une maladie génétique

Les recherches sur le cancer tentent d'élucider les mécanismes biologiques, biochimiques et moléculaires qui sous-tendent le développement progressif des tumeurs. Les chercheurs veulent acquérir le plus de connaissances possibles sur les transformations que subissent les cellules entre leur état normal et leur état malin. Durant le siècle dernier, des chercheurs ont observé que les cellules malignes démontrent un taux anormalement élevé d'aberrations génétiques (Muller, 1927; Comings, 1973; Ponder, 2001). On pense aujourd'hui que le développement des cancers serait relié à une accumulation progressive d'aberrations génétiques (Loeb *et al.*, 2003). Le taux de mutation dans une cellule humaine est d'environ 175 mutations par cellule par génération (Nachman et Crowell, 2000). Ces mutations apparaissent spontanément ou sont induites par des agents carcinogènes. Ces mutations s'accumuleraient progressivement dans les cellules au cours de la vie et expliquerait l'augmentation exponentielle de l'incidence des cancers avec l'âge (Nordling, 1953; Armitage et Doll, 1954). La littérature divise la mutagenèse tumorale en trois stades distincts :

1. Initiation : mutation irréversible d'une cellule par un agent carcinogène initiateur conduisant à la formation d'une cellule initiée qui possède un avantage de croissance (Berenblum, 1941; Rous et Kidd, 1941 ; Berenblum et Shubik, 1947).

2. Promotion : sous l'influence de certains agents promoteurs qui stimulent la prolifération, la cellule initiée amorcera une expansion clonale et donnera naissance à une population de cellules initiées. Une exposition prolongée (en moyenne ≥ 20 ans) aux agents promoteurs favorisera l'acquisition de nouvelles mutations au sein des cellules initiées (Berenblum, 1941; Rous et Kidd, 1941; Berenblum et Shubik, 1947).
3. Progression : une cellule initiée va acquérir les mutations nécessaires pour devenir maligne. En 1976, Nowell suggéra que la progression tumorale serait le résultat d'une évolution clonale. L'expansion clonale d'une cellule maligne provoquerait l'apparition de nombreux variants, possédant diverses aberrations génétiques. La plupart des variants mourront suite à un dysfonctionnement métabolique. Toutefois, un de ces variants pourra acquérir un avantage de croissance additionnel et sa progéniture deviendra la sous-population dominante au sein de la tumeur. Cette sous population restera dominante jusqu'à ce qu'un variant plus agressif apparaisse. Ce processus sera répété à plusieurs reprises dans la tumeur. Les cellules d'une tumeur possèdent donc certaines anomalies génétiques en communs révélant leurs origines clonales. Toutefois, une certaine hétérogénéité subsiste entre ces cellules permettant le mécanisme d'évolution clonale (Fialkow, 1974).

De toute évidence, une tumeur n'apparaît pas à la suite d'un événement unique, mais implique un processus à étapes multiples. Plusieurs mutations devront se produire dans une même cellule pour qu'elle devienne cancéreuse (Loeb *et al.*, 2003; Moolgavkar et Luebeck, 2003). L'initiation et la promotion d'une tumeur nécessitent plusieurs changements génétiques et des changements additionnels devront survenir pour que la tumeur puisse croître, envahir les tissus environnants et causer des métastases (progression).

Dans les cellules normales, les proto-oncogènes codent pour des protéines qui favorisent la croissance et la division cellulaire; les gènes suppresseurs de tumeurs codent pour des protéines qui inhibent la croissance et la division cellulaire. La fonction des gènes peut être altérée par différents mécanismes mutationnels. Dans les tumeurs, les mutations peuvent activer les proto-oncogènes, d'autres mutations peuvent inhiber les gènes suppresseurs de tumeurs (Levine, 1993). Ces mutations favorisent la prolifération anarchique des cellules. Les gènes impliqués dans les cancers ne sont pas encore tous

connus. Le but de cette thèse est d'identifier de nouveaux gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans le cancer du sein, par la cartographie des mutations dans le génome des tumeurs.

1.2 Le cancer du sein

Le cancer du sein est le cancer le plus diagnostiqué au Canada : une canadienne sur neuf en souffrira au cours de sa vie. Ce cancer représente également la deuxième cause de décès par cancer au pays : une femme sur 25 devrait en mourir (INCC, 1999; INCC, 2004). Les cancers du sein sont décelés par la présence d'un nodule suite à une palpation mammaire ou une mammographie (van de Vijver, 1993; Sakorafas et Tsiotou, 2000). Les tumeurs du sein sont habituellement excisées par chirurgie. La récurrence locale demeure cependant un problème majeur. La mort des patients est rarement causée par la tumeur primaire, mais plutôt par la formation de métastases qui colonisent les ganglions adjacents, la moelle osseuse, les poumons et le foie (Bièche et Lidereau, 1995). L'âge représente le principal facteur de risque du cancer du sein (l'âge moyen au diagnostic est de 55 ans) (Bryant et Brasher, 1994). La prévention représente la stratégie la plus efficace: un dépistage systématique par mammographie chez les femmes de 50 à 69 ans réduirait la mortalité de 30 % (Fletcher *et al.*, 1993). Les antécédents familiaux représentent également un facteur de risque important (Kelsey et Bernstein, 1996). Le chirurgien français Paul Broca (1866) a été le premier à rapporter la fréquence élevée de cancer du sein parmi les membres d'une même famille. Un siècle plus tard, Anderson a évalué que l'incidence du cancer du sein augmente de 39 fois dans les familles atteintes (Anderson, 1974, 1976). La mastectomie est alors recommandée pour ces femmes à haut risque (Hartmann *et al.*, 1999).

1.2.1 Anatomie du sein

Le sein est une masse de tissus glandulaires et adipeux située à la surface du grand pectoral, servant à la sécrétion du lait. Contrairement à la majorité des organes, le sein se transforme continuellement au cours de la vie adulte (puberté- menstruations-grossesses- allaitement) sous l'influence de différentes hormones (Wiseman et Werb, 2002).

Le sein se compose de 15 à 20 lobes indépendants contenant plusieurs lobules producteurs de lait (Figure 1.1). Les canaux galactophores drainent le lait des lobes et lobules vers le mamelon. Un tissu adipeux parsemé de vaisseaux sanguins et lymphatiques entoure ces structures (Hovey et Trott, 2004).

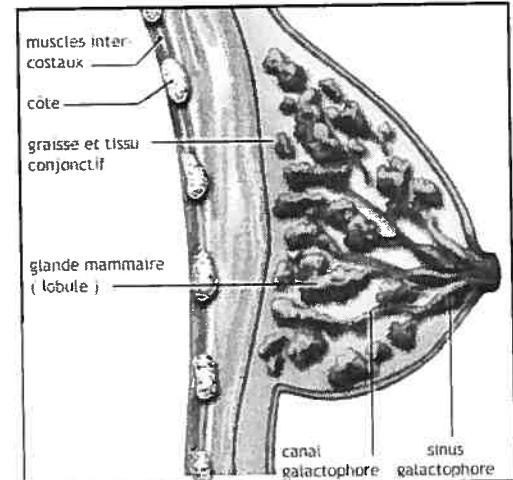
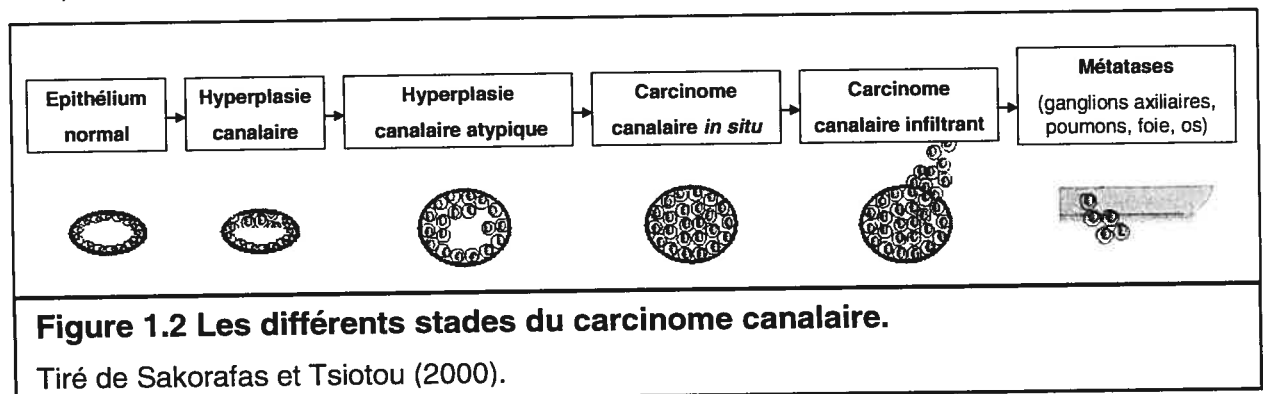


Figure 1.1 Structure du sein chez la femme.

Tiré du site Web medisite.fr (2000).

1.2.2 Le carcinome canalaire

La majorité des cancers du sein se développent à partir des cellules épithéliales des canaux galactophores (van de Vijver, 1993). Les tumeurs canalaire sont le résultat d'une lente évolution comprenant 3 stades distincts : l'hyperplasie, le carcinome *in situ* et le carcinome invasif (Sakorafas et Tsiotou, 2000). Premièrement, les cellules épithéliales qui tapissent les canaux galactophores du sein peuvent démontrer de l'hyperplasie, c'est-à-dire une prolifération intraluminaire de cellules qui combleront progressivement les lumières des canaux (Figure 1.2). Par la suite, certaines cellules hyperplasiques donneront naissance au carcinome canalaire *in situ* (CCIS), une tumeur précoce composée de cellules malignes qui ne traversent pas la paroi des canaux (Broders, 1932). Le CCIS représente de 10 à 15 % de l'ensemble des cancers du sein (Ernster *et al.*, 1996). Finalement, la rupture et le franchissement de la membrane basale est un critère primordial pour distinguer le cancer *in situ* du cancer invasif. Dans le cas du carcinome canalaire envahissant, les cellules cancéreuses traversent la paroi des canaux pour envahir les tissus environnants. Le carcinome canalaire envahissant représente à lui seul, de 50 à 75 % de tous les cas de cancer du sein (van de Vijver, 1993).



1.2.3 Détection des anomalies génétiques du cancer du sein

Contrairement aux leucémies et aux lymphomes, le caryotype des tumeurs du sein révèle un patron d'anomalies génétiques complexes, initialement interprété comme un ensemble de perturbations non spécifiques (Bièche et Lidereau, 1995). Les tumeurs du sein sont habituellement dépistées de façons tardives et démontrent de l'instabilité génétique et de l'hétérogénéité (Coleman et Tsongalis, 1999; Grellier *et al.*, 1996). Malgré tout, il est possible de distinguer plusieurs anomalies génétiques récurrentes dans les tumeurs. Ces anomalies récurrentes représentent une source d'information précieuse pour la localisation de nouveaux gènes impliqués dans le cancer du sein (Bièche et Lidereau, 1995).

Les scientifiques ignorent le nombre exact de mutations nécessaire au développement du cancer du sein. Les altérations les plus courantes dans les tumeurs du sein sont les délétions, pouvant inhiber les gènes suppresseurs de tumeurs (van de Vijver, 1993). La majorité des gènes suppresseurs de tumeurs ont été découvert par clonage positionnel dans le génome des tumeurs. Le clonage positionnel ou «reverse² genetics», identifie un gène responsable d'une maladie par la localisation d'un *locus mutant* dans le génome (Takahashi *et al.*, 1994). Autrefois longue et coûteuse, l'approche positionnelle est maintenant facilitée par le séquençage des génomes. Le clonage positionnel comprend généralement les étapes suivantes :

- 1) Délimitation d'un *locus mutant* au sein d'un génome malade par l'analyse du caryotype, la recherche de QTL («Quantitative Trait Loci») ou l'analyse LOH.
- 2) Construction d'un contig couvrant le *locus mutant* par le criblage d'une librairie de clones YAC, BAC ou cosmides.
- 3) Inventaire des séquences codantes au sein du *locus mutant* : consultation des cartes physiques et génétiques. Il existe de nombreux EST («Express Tag Sequences») cartographiés dans les banques publiques.
- 4) Identification de gènes candidats potentiels au sein du *locus mutant* selon : leurs fonctions, leurs motifs, leurs localisations et leurs niveaux d'expressions dans les tumeurs.

² Par opposition au clonage fonctionnel qui identifie un gène responsable d'une maladie en se basant sur sa fonction.

- 5) Recherche de mutations au sein des gènes candidats par séquençage ou par la migration de fragments d'ADN (Fischer *et al.*, 1983; Cotton *et al.*, 1988; Ganguly *et al.*, 1993).
- 6) Expériences expérimentales démontrant la participation du gène candidat au développement de la maladie.

Dans le génome des tumeurs, la cartographie des délétions (LOH) a mené à la localisation de plusieurs *locus mutants* et à la découverte de plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs. Les prochaines sections s'attardent à la théorie concernant les gènes suppresseurs de tumeurs et les méthodes employées pour leurs localisations.

1.3 Les gènes suppresseurs de tumeurs

Un gène est considéré comme un gène suppresseur de tumeurs (GST) lorsque sa perte de fonction («loss-of-function») dans la cellule favorise la croissance des tumeurs (Knudson, 1993, 2001; Weinberg, 1991, 1993; Sherr, 2004). Peu de GST ont été identifiés jusqu'à maintenant. Parmi les plus importants, on compte les gènes : APC, ATM, BRCA1, BRCA2, CHK2, FHIT, PMS2, PTEN, P16, P53, MSH2, MLH1, NF1, NF2, RB, VHL, WT-1, (Levine, 1993; Macleod, 2000; Sherr 2004). Ces gènes occupent différents rôles dans la cellule : maintenance de l'intégrité du génome, régulation du cycle cellulaire, de la différenciation, de l'apoptose, etc (Levine, 1993; Dankort et Muller, 2000; Sherr, 2004).

La raison d'être d'un gène suppresseur de tumeurs n'est pas de protéger l'organisme contre le cancer. Toutefois, ces gènes s'opposent naturellement aux processus tumoraux en régulant de façon négative la division cellulaire (van de Vijver, 1993). Par conséquent, les événements génétiques pouvant inhiber les GST seront sélectionnés par la tumeur. Les deux allèles doivent être inactivés pour supprimer complètement la fonction du gène suppresseur et favoriser la malignité (Sherr, 2004). Le premier événement qui survient lors de l'inactivation est généralement une mutation qui inhibe un des deux allèles. Cette mutation peut être transmise de façon héréditaire³ (cancers familiaux) ou survenir de façon sporadique dans les cellules somatiques. Un seul événement supplémentaire, la perte du deuxième allèle, pourra engager la cancérisation. Ce deuxième événement implique

³ Les mutations des gamètes sont généralement des mutations ponctuelles, car une large délétion serait dommageable pour le développement de l'embryon, donc difficilement transmissible.

généralement la délétion d'un large segment chromosomique ou d'un chromosome entier (Devilee *et al.*, 2001; Balmain, 2002a; Lohmann et Gallie, 2004).

1.3.1 Découverte des gènes suppresseurs de tumeurs

Au début du siècle dernier, Theodor Boveri (1929) suggéra que pour devenir maligne, une cellule doit physiquement éliminer les chromosomes qui inhibent sa croissance. La découverte du concept de GST au début des années soixante-dix mettra en lumière le caractère visionnaire de Boveri (Balmain, 2001; Wunderlich, 2002). Deux étapes jalonnent la découverte du concept de GST : 1) la fusion des cellules somatiques et 2) les études épidémiologiques du rétinoblastome.

1.3.1.1 Fusion des cellules somatiques

En 1962, Okada démontre que l'infection d'une cellule par le virus Sendai induit la formation de cellules géantes polynucléaires. Suite à cette découverte, des chercheurs fusionnèrent des cellules cancéreuses et des cellules normales. Plusieurs de ces cellules hybrides sont dès lors incapables de former des tumeurs chez les animaux, mais peuvent redevenir malignes suite à la perte de chromosomes provenant du parent normal (Harris *et al.*, 1969, 1971). Ces études suggèrent que des gènes provenant des cellules normales puissent inhiber la malignité des cellules cancéreuses. La réintroduction progressive des chromosomes («microcell fusion») au sein des cellules cancéreuses a permis d'identifier les chromosomes qui inhibent la formation des tumeurs (Levine, 1993). Ces expériences démontrent le caractère récessif du cancer.

1.3.1.2 Études épidémiologiques du rétinoblastome

Le rétinoblastome est une tumeur intra-oculaire rare impliquant les cellules souches de la rétine qui affecte généralement les enfants de moins de cinq ans, lesquels démontrent du strabisme et une leucocorie (reflet blanc de la pupille) (Pendergrass et Davis, 1980; Gallie et Phillips, 1982). Le suivi d'une cohorte de 48 patients et la consultation d'études antérieures (notamment celle de Smith et Sorsby, 1958), permirent à Knudson (1971) de formuler les observations suivantes :

1. Le rétinoblastome bilatéral est généralement héréditaire; le rétinoblastome unilatéral est généralement spontané.

2. L'âge moyen au diagnostic du rétinoblastome bilatéral est de 11 mois, alors qu'il est de 22 mois pour le rétinoblastome unilatéral.

Knudson (1971) a relié ces observations épidémiologiques à l'hypothèse voulant que le rétinoblastome soit causé par deux mutations indépendantes. La première mutation serait dans les cas familiaux, transmise directement des parents aux enfants par l'entremise des cellules germinales. Par conséquent, les individus porteurs de cette mutation n'auront qu'à acquérir une mutation supplémentaire dans les cellules somatiques pour développer une tumeur de façon précoce (11 mois). Cette mutation supplémentaire peut apparaître au sein de chaque œil (rétinoblastome bilatérale) ou dans un seul œil. Dans les cas spontanés, le délai pour acquérir au hasard deux mutations somatiques dans le même gène, au sein d'un même œil, s'avère plus long (22 mois). La probabilité que deux mutations indépendantes surviennent dans chaque œil est faible (rétinoblastome unilatérale). Knudson en conclut que le rétinoblastome est causé par deux mutations indépendantes, il formulera alors le paradigme suivant : deux mutations indépendantes vont provoquer la perte de fonction des deux allèles d'un gène suppresseur de tumeurs et favoriser le développement de la tumeur (Knudson, 1971, 1973, 1978). Toutefois, le modèle mathématique de Knudson devait être démontré expérimentalement. Plusieurs chercheurs se mirent alors sur la trace d'un gène suppresseur de tumeurs responsable du rétinoblastome :

- Premièrement, Orye *et al.* (1971) rapportèrent une délétion au niveau du bras long (q) du chromosome 13 d'un patient atteint du rétinoblastome. Par la suite, Francke et Kung (1976) observèrent une délétion interstitielle au niveau de la bande q14 du chromosome 13.
- Deuxièmement, Cavenee *et al.* (1983) développèrent une méthode permettant de localiser le gène Rb au niveau moléculaire : la méthode LOH. Plusieurs LOH ont été détectés au niveau de la région 13q14 sur l'ADN de rétinoblastomes.
- Troisièmement, Friend *et al.* (1986) identifièrent un gène candidat à l'intérieur du locus délété dont l'expression est abolie au sein du rétinoblastome. On assiste alors au clonage du premier GST : le gène Rb.
- Quatrièmement, l'analyse de la séquence du gène Rb dans les tumeurs confirma l'hypothèse de Knudson (Dunn *et al.*, 1988). Dans les cancers familiaux, l'allèle muté est transmis de façon héréditaire et l'allèle normal est perdu suite à une

mutation somatique. Dans les cancers spontanés, une mutation somatique survient sur chaque allèle.

- Comme preuve ultime, l'introduction d'un allèle sauvage du gène Rb dans des lignées cellulaires provenant de rétinoblastomes, abolie la capacité des cellules de provoquer des tumeurs (Huang *et al.*, 1988).

Le gène Rb est le prototype des gènes suppresseurs de tumeurs. Un individu qui hérite d'une copie non fonctionnelle du gène Rb possède 90 % de risque de développer un rétinoblastome à un âge précoce (Knudson *et al.*, 1991). Dans les sections suivantes, nous verrons que le clonage du gène Rb suscita un engouement énorme pour la recherche de nouveaux GST.

1.3.2 La détection des gènes suppresseurs de tumeurs

Après le clonage du gène Rb, la détection des délétions dans les génomes tumoraux est devenue un outil populaire pour la recherche de nouveaux GST. Selon toute vraisemblance, des délétions récurrentes affectant un locus chromosomique particulier laisse fortement supposer la présence d'un important GST. Par conséquent, il est possible de localiser de nouveaux GST en analysant les patrons de délétions affectant les chromosomes des tumeurs. Les méthodes permettant de détecter ces délétions proviennent de la cytogénétique et de la biologie moléculaire.

1.3.2.1 Les méthodes cytogénétiques

a) Analyse du caryotype

Les remaniements majeurs affectant les chromosomes en métaphases (délétions, translocations, duplications et inversions) sont visibles au microscope. Les techniques de marquages chromosomiques permettent de localiser grossièrement ces dommages (Dutrillaux et Couturier, 1981). Cependant, les préparations chromosomiques des tumeurs solides sont généralement de piètres qualités et difficiles à interpréter (van de Vijver, 1993).

b) Analyse CGH («Comparative Genome Hybridization»)

La méthode CGH permet de cribler l'ensemble d'un génome pour les pertes et les amplifications en une seule expérience (Kallioniemi *et al.*, 1992a). L'ADN provenant de

cellules normales et de cellules cancéreuses est hybridé simultanément sur des chromosomes normaux en métaphase. L'augmentation ou la réduction du ratio de l'un ou l'autre de ces ADN le long des chromosomes indique l'augmentation et la diminution du nombre de copies dans la tumeur. Cette technique cytogénétique possède une résolution variant de 10-20 Mb et demeure insensible aux réarrangements ne provoquant aucun changement du nombre de copies (Gray et Collins, 2000).

1.3.2.2 Les méthodes moléculaires ou LOH

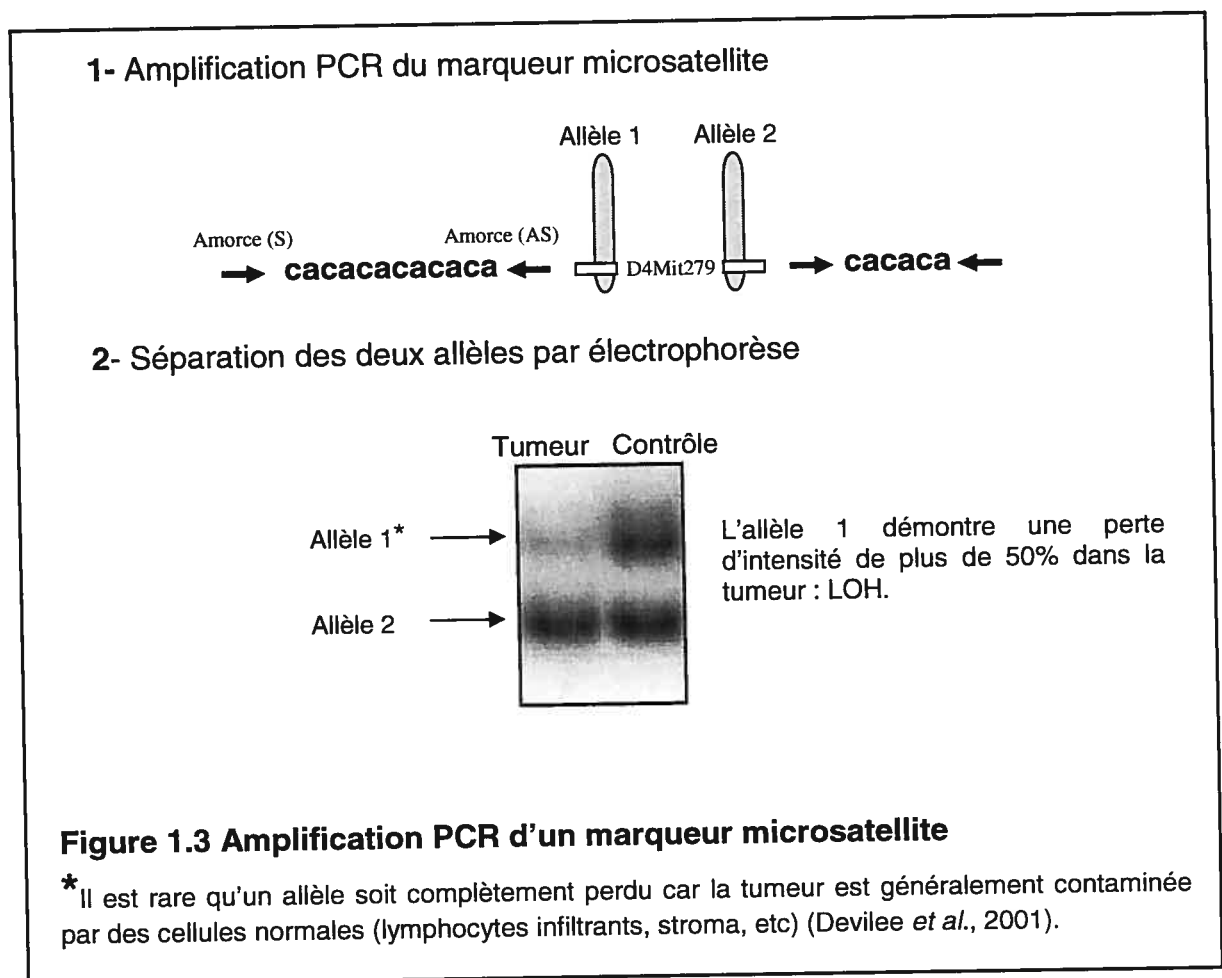
Suite à la perte physique d'un fragment chromosomique, la cellule devient hémizygote au niveau de la région manquante. Comme un allèle est perdu et que la cellule n'est plus hétérozygote, on dit alors qu'il y a perte d'hétérozygote (en anglais «Loss Of Heterozygosity» ou LOH). Le principe des méthodes LOH est d'isoler les deux allèles d'un locus génétique pour détecter la perte d'un allèle. Dans les cellules normales, le ratio des allèles est de 1:1. Dans le génome des tumeurs, ce ratio est fréquemment perturbé.

a) La technique RFLP («Restriction Fragment Length Polymorphism»)

La technique RFLP a été utilisée par Cavenee *et al.* (1983) pour localiser le locus du gène Rb au niveau moléculaire. Cette méthode prend avantage des nombreux sites de restrictions dans les génomes et du polymorphisme de ces sites entre les deux allèles. L'ADN de la tumeur est digéré par un enzyme de restriction spécifique et les fragments de restrictions sont soumis à l'électrophorèse. Ces fragments sont ensuite dénaturés et transférés par buvardage (E.M. Southern) sur un filtre de nitrocellulose. Le filtre est incubé avec une sonde radioactive qui reconnaît un fragment d'ADN unique. Ce fragment doit contenir un site de restriction présent uniquement sur l'un des deux allèles. Les deux allèles sont alors révélés séparément, permettant d'évaluer leurs intensités respectives. La création d'une banque de SNP («Single Nucleotide Polymorphism») facilite la localisation de nouveaux sites de restrictions polymorphiques.

b) Amplification PCR de séquences microsatellites

Le développement d'un grand nombre de marqueurs microsatellites consacra la méthode LOH comme un outil de prédilection dans la recherche de délétions dans le génome des tumeurs. Les marqueurs microsatellites sont de courtes séquences (de 1 à 6 bases) répétées en tandem (entre 10 et 60 fois) et polymorphiques quant au nombre de répétitions. Les séquences microsatellites sont réparties aléatoirement dans le génome. Les séquences microsatellites les plus utilisées sont les di-nucléotides de CA et de GT (Trecó et Arnheim, 1986; Sargent *et al.*, 1996; Dutreix, 1997; Gendrel *et al.*, 2000). Dans le génome, ces répétitions sont entourées de séquences uniques permettant leur amplification PCR spécifique (Figure 1.3).

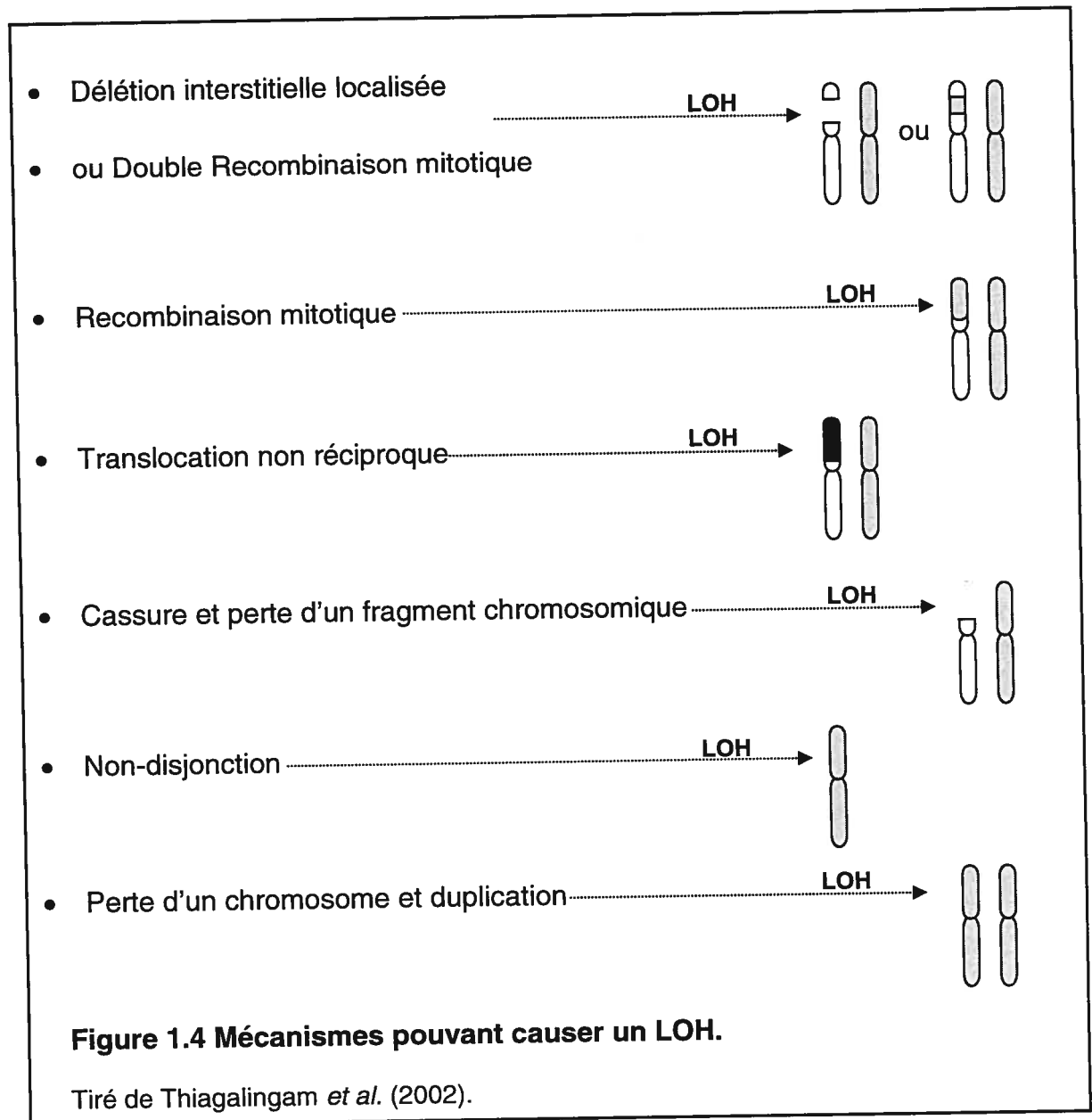


L'amplification PCR de séquences microsatellites polymorphiques a révolutionné les technologies de génotypage. Densément répartis au sein des génomes, les marqueurs microsatellites ont été utilisés pour la confection des cartes *génétiques* chez la souris et chez l'humain (Weissenbach *et al.*, 1992; Gyapay *et al.*, 1994; Dietrich *et al.*, 1994). Aujourd'hui localisés au sein des cartes *physiques*, les marqueurs microsatellites permettent une cartographie précise des délétions dans les génomes tumoraux. Deux mécanismes semblent expliquer le haut taux de polymorphisme des séquences microsatellites : le glissement de l'ADN polymérase lors de la réplication des séquences et une recombinaison inégale entre deux séquences microsatellites (Smith 1973; Levinson et Gutman, 1987; Streisinger, 1996).

La fonction précise des séquences microsatellites demeure inconnue. Plusieurs groupes ont démontré que les séquences microsatellites augmentent le niveau de recombinaison (Bullock *et al.*, 1986; Murphy et Stringer, 1986; Treco et Arnheim, 1986; Sargent *et al.*, 1996; Dutreix, 1997; Gendrel *et al.*, 2000). La protéine recombinante RecA lie fortement les séquences répétées de GT/CA et cette affinité augmente avec le nombre de répétitions (Dutreix, 1997). D'autres études ont démontré que les séquences microsatellites *augmentent* (Nordheim et Rich, 1983; Hamada *et al.*, 1984; Berg *et al.*, 1989) *ou inhibent* (Santoro *et al.*, 1984; Naylor et Clark, 1990; Shimajiri *et al.*, 1999; Rothenburg *et al.*, 2001) l'expression des gènes. L'activité «enhancer» des séquences microsatellites est indépendante de l'orientation et de la position de ces séquences (Hamada *et al.*, 1984). Finalement, les séquences microsatellites influencent l'épissage des transcrits. En effet, la répétition de CA de l'intron 13 du gène humain eNOS («endothelial nitric oxide synthase gene») fonctionne comme un «intronic splicing enhancer» dont l'activité dépend directement du nombre de CA (Hui *et al.*, 2003a, 2003b).

1.3.3 La perte d'hétérozygité

Comme nous venons de le constater, les méthodes LOH permettent de détecter les délétions au sein des génomes tumoraux. Toutefois, il est important de préciser que la délétion n'est pas l'unique réarrangement pouvant causer la perte d'hétérozygité. La figure 1.4 illustre divers mécanismes pouvant causer un LOH.

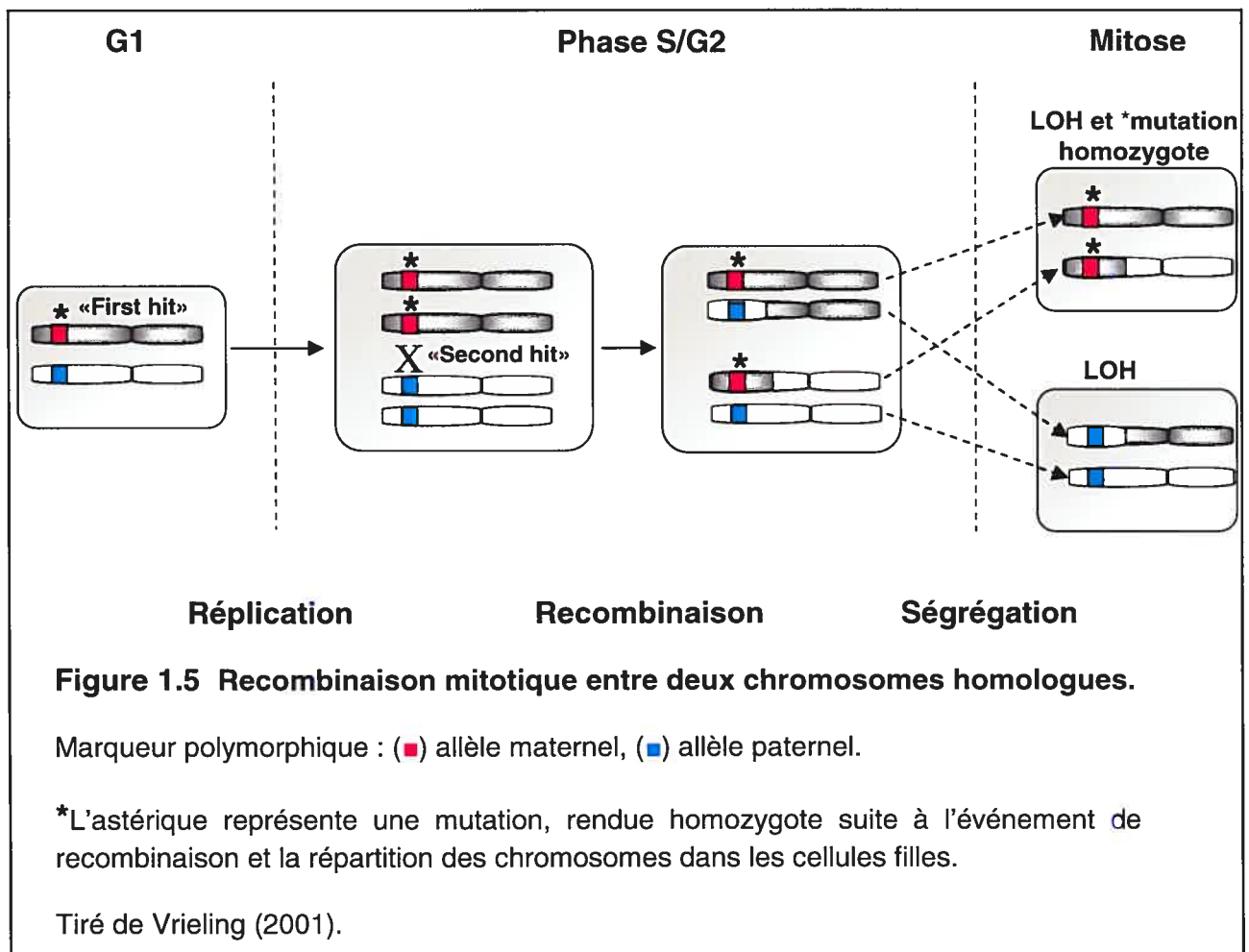


Le but premier des méthodes LOH est de détecter les délétions. Mais de toute évidence, l'analyse LOH révèle un portrait moléculaire beaucoup plus complexe. Parmi les mécanismes mentionnés, la recombinaison mitotique semble être une cause fréquente de LOH.

1.3.3.1 La recombinaison mitotique et la perte d'hétérozygosit 

Lors de la mitose, deux chromosomes homologues peuvent se retrouver par hasard en position d'appariement et établir un intermédiaire de recombinaison formé de deux jonctions de Holliday (McKee, 2004; Heyer, 2004). La réparation de l'ADN implique ensuite des événements de conversion génique, c'est à dire le recopiage d'une chromatide à partir de la chromatide homologue (transfert unidirectionnelle d'information). Les intermédiaires de recombinaison peuvent parfois se résoudre par un «crossing-over» ( changes réciproques de chromatides). La recombinaison mitotique engendre donc toujours de la conversion génique et occasionnellement un «crossing-over» (Szostak *et al.*, 1983; Helleday, 2003). Les «crossing-over» modifient souvent les séquences adjacentes et peuvent avoir des conséquences biologiques néfastes (Bishop et Schiestl, 2003).

L'importance consacrée à la recombinaison mitotique dans le cancer s'est accru durant la dernière décennie. Plusieurs articles relatent l'importance de la recombinaison mitotique dans l'apparition des LOH (Gupta *et al.*, 1997; Tischfield, 1997; Shao *et al.*, 1999). Par exemple, plusieurs LOH observés au niveau du locus Rb seraient causés par des événements de recombinaison (Hagstrom et Dryja, 1999; Kallioniemi *et al.*, 1992b; Zhu *et al.*, 1992). En plus de causer un LOH, un événement de recombinaison mitotique entre deux chromosomes homologues peut rendre une mutation homozygote (Vrieling, 2001). Un modèle maintenant envisagé dans l'inhibition des GST est : la mutation d'un allèle («first hit») suivi de la recombinaison de l'allèle muté avec un chromosome homologue («second hit») pour que la mutation devienne homozygote (Figure 1.5, page suivante) (Knudson, 2002).



La cellule fille mutée de façon homozygote donnera naissance à une sous-population de cellules dominantes dans la tumeur. Une perte d'hétérozygote (LOH) sera alors détectée le long du locus recombiné. Les événements de recombinaisons peuvent s'accumuler au cours des divisions cellulaires et produisent un patron de LOH en mosaïque (alternance de régions hétérozygotes et de régions LOH) le long des chromosomes des tumeurs (Blackburn *et al.*, 2004).

1.3.4 LOH dans les génomes tumoraux

Désormais, nous connaissons les méthodes pour détecter les délétions et les LOH, il nous reste maintenant à décrire les LOH détectés dans les génomes tumoraux. La fréquence de LOH est élevée dans plusieurs types de tumeurs. Comme les études LOH sont excessivement nombreuses, il est difficile de les résumer toutes selon un plan entièrement rationnel. Les paragraphes suivants présentent les études LOH démontrant des liens directs avec nos travaux, soit : le cancer du sein, le chromosome 1p humain et le chromosome 4 murin.

1.3.4.1 LOH dans le cancer du sein

Les LOH sont fréquents dans les tumeurs du sein. Les patrons de délétions dans les tumeurs du sein varient selon : a) le mode de transmission (héréditaire versus sporadique), b) le type de tumeur (canalaire versus lobulaire) et c) le stade de la tumeur (*in situ* versus invasif) (Nishizaki *et al.*, 1997; Tirkkonen *et al.*, 1997). Les bras chromosomiques les plus affectés dans le cancer du sein sont : **1p - 3p** (FHIT)⁴ - **6q** (IGFR2) - **7q** - **8p** - **10q** (PTEN) - **11q** - **13q** (RB1, BRCA2) - **16q** (CDH1, MSH2) - **17p** (P53) - **17q** (BRCA1) - **18q** et **22q** (Ingvarsson, 1999 ; Bièche et Lidereau, 1995; van de Vijver, 1993). Pour un résumé exhaustif des études LOH dans les tumeurs du sein, nous recommandons la consultation de l'article de Osborne et Hamshire (2000). Cet article localise sur chacun des chromosomes humains, les loci LOH provenant de 143 études différentes.

⁴ Les gènes entre parenthèses sont cartographiés sur les bras chromosomiques délétés.

1.3.4.2 LOH sur le bras chromosomique 1p humain

Plusieurs bras chromosomiques sont délétés dans le cancer du sein. La perte du bras 1p semble récurrente dans plusieurs types de tumeurs (Atkin, 1986). Voici 3 articles décrivant la perte du bras chromosomique 1p :

- a) L'article de Schwab *et al.* (1996) résume les délétions de la région 1p provenant de 18 études différentes et utilisant différents types de tumeurs. Ces délétions affectent différentes régions du bras chromosomique 1p. Les auteurs proposent que 1p renferme plusieurs GST potentiels.
- b) Le groupe d'Ingvarsson a analysé 15 marqueurs microsatellites répartis le long du bras 1p sur 683 tumeurs humaines provenant: du sein, de l'estomac, du colon, du rectum, des poumons, des ovaires, des testicules, du rein, des thyroïdes, etc (Ragnarsson *et al.*, 1999). Plus de la moitié (54%) des tumeurs démontre au moins un LOH sur le bras 1p. Sur les 238 tumeurs du sein examinées, 145 (61%) démontrent un LOH au niveau de 1p. Les plus forts pourcentages de LOH se retrouvent dans les régions : 1p31, 1p32, 1p34.3, 1p35 1p36.1, 1p36.3 (Ragnarsson *et al.*, 1999).
- c) Finalement, Bièche et son équipe ont démontré que 47.3% des tumeurs du sein (N = 74) démontrent des pertes au niveau du chromosome 1p, notamment dans les régions 1p34-36 et 1p13-22 (Bièche *et al.*, 1993; Bièche *et al.*, 1994). «Most authors consider», écrit Ivan Bièche, «that chromosome 1 is the most frequently altered in breast cancer». Des gains sont généralement observés sur le bras long et des pertes sur le bras court du chromosome 1 (Bièche et Lidereau, 1995; van de Vijver, 1993).

Ces trois études ne représentent qu'une fraction des études LOH effectuées sur le bras chromosomique 1p.

1.3.4.3 LOH sur le chromosome 4 de souris

Le chromosome 4 de souris est en syntenie avec le bras chromosomique 1p. Comme dans les tumeurs humaines, les tumeurs provenant des modèles animaux démontrent une forte incidence de LOH sur le chromosome 4.

Tableau I. Modèles démontrant un fort pourcentage de LOH sur le chromosome 4 suite à l'analyse de l'ensemble des chromosomes des tumeurs.

Mode d'induction des tumeurs	Type de tumeur	% des tumeurs démontrant un LOH sur le chromosome 4	Références
Oncogène-MMTV/neu	Mammaire	50 %	Cool et Jolicoeur, 1999
Oncogène-MMTV/neu	Mammaire	82 %	Ritland <i>et al.</i> , 1997
Oncogène-MMTV/ v-Ha-ras	Mammaire	38 %	Radany <i>et al.</i> , 1997
Chimique- DMBA	Mammaire	25 %	Aldaz <i>et al.</i> , 1996
Oncogène-WHV/c-myc	Foie	21.6 %	Wu <i>et al.</i> , 2002
Physique- radiation	Leucémie et lymphome	38-50 %	Cleary <i>et al.</i> , 1999.
Physique- radiation	Lymphome	50 %	Okumoto <i>et al.</i> , 1999
Physique- radiation «Fas-Heterozygous deficient mice»	Lymphome	12-21 %	Ogawa <i>et al.</i> , 2004
Chimique- DMBA et TPA	Peau	25 %	Stern <i>et al.</i> , 2000
Chimique- MGP	Pulmonaire	35 %	Benavides <i>et al.</i> , 2003
Spontanée	Poumon	77 %	Herzog <i>et al.</i> , 2002

En résumé, les remaniements affectants le bras chromosomique 1p et son homologue de souris le chromosome 4, semblent prédominants dans plusieurs types de tumeurs (Olah *et al.*, 1989).

1.3.5 Les gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans le cancer du sein

L'observation de nombreux réarrangements chromosomiques dans les tumeurs laisse présager de nombreux changements au niveau moléculaire. Selon Knudson, les deux allèles d'un GST doivent être inactivés de façon indépendante pour modifier le phénotype d'une cellule : un allèle serait inactivé par délétion, l'autre allèle serait inactivé par mutation. Les paragraphes suivants présentent les principaux GST impliqués dans le cancer du sein. Ces gènes sont cartographiés à l'intérieur des loci LOH et sont, dans la plupart des cas, également mutés sur l'allèle intact en accord avec l'hypothèse de Knudson. La somme d'information consacré à ces GST est colossale, les références suivantes sont par défaut anecdotiques.

1.3.5.1 Les gènes suppresseurs de tumeurs dans le cancer du sein sporadique

Dans le cancer du sein sporadique, les deux allèles d'un GST sont inactivés par des mutations somatiques.

P53, 17p13.1

Isolé par DeLeo *et al.* (1979), le gène P53 est un important régulateur du cycle cellulaire. P53 influence le niveau d'expression des gènes p21, mdm2, GADD45, cyclin G, bax, IGFBP-3 (Oesterreich et Fuqua, 1999). De plus, P53 préserve l'intégrité du génome : lorsque l'ADN est endommagé, les niveaux de la protéine P53 augmentent et le cycle cellulaire bloque en G1 (Greenblatt *et al.*, 1994). P53 est muté dans 50 % des tumeurs humaines (Hollstein *et al.*, 1991). Dans les tumeurs du sein, la fréquence de mutation varie entre 15 et 34 % et ces mutations sont associées à une perte d'hétérozygosit  de la région 17p13.1 conformément à l'hypothèse de Knudson (Cornelis *et al.*, 1994; Ozbun et Butel, 1995; Hartmann *et al.*, 1997).

Rb, 13q14

Le gène Rb est un important régulateur du «checkpoint» G1 (DeCaprio *et al.*, 1989; Buchkovich *et al.*, 1989 ; Chen *et al.*, 1989). La protéine Rb prévient l'entrée des cellules en phase S en inhibant l'activité transcriptionnelle des membres de la famille E2F (Helin *et al.*, 1992). Environ 20 à 30 % des tumeurs du sein démontrent des mutations du gène Rb (Oesterreich et Fuqua, 1999). De plus, la perte de la région 13q14 semble impliqué dans la progression des tumeurs (T'Ang *et al.*, 1988; Andersen *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1988).

Les GST suivants démontrent une plus faible pénétrance dans le cancer du sein spontané:

CDH1, 16q22.1

Le gène CDH1 encode une protéine responsable de l'adhésion cellulaire, notamment au sein des cellules épithéliales. La baisse d'expression du gène CDH1 dans les tumeurs favorise l'invasion et les métastases. Ce gène est localisé dans une région fréquemment délétée dans le cancer du sein. Le gène CDH1 est muté dans les tumeurs du sein de type lobulaire, mais rarement dans les tumeurs canalaire (Berx *et al.*, 1995, 1996; Ingvarsson, 1999).

FHIT, 3p14.2

FHIT est un gène de plus de 500 kb qui encode une protéine similaire à aph1 (S. pombe). La localisation du gène FHIT correspond en partie au site fragile FRA3B. Trois groupes rapportent la perte et/ou la mutation du gène FHIT dans le cancer du sein (Negrini *et al.*, 1996; Ahmadian *et al.*, 1997; Hayashi *et al.*, 1997).

APC, 5q21

Le gène APC participe à l'adhésion cellulaire en formant un complexe avec les protéines catenines et en régulant la transmission du signal d'inhibition de contact à l'intérieur de la cellule. Trois études indépendantes rapportent des LOH au niveau du locus APC dans des tumeurs du sein (Thompson *et al.*, 1993 ; Kashiwaba *et al.*, 1994 ; Medeiros *et al.*, 1994).

IGF2R, 6q26-27

La protéine IGF2R est une hormone homologue à l'insuline et à IGF I. Le gène IGF2R possède une empreinte parentale chez la souris. Hankins *et al.* (1996) rapporte que le locus d'IGF2R est la cible de LOH dans les tumeurs du sein et que certaines tumeurs du sein démontrent des mutations affectant le gène IGF2R.

1.3.5.2 Les gènes suppresseurs de tumeurs dans le cancer du sein héréditaire

La transmission héréditaire d'une copie altérée d'un GST cause une prédisposition au cancer. Cette théorie fut étayée par le clonage des gènes BRCA1 et BRCA2 chez les patientes atteintes du cancer du sein héréditaire. Un allèle muté est transmis par les gamètes, l'autre allèle est inactivé dans les cellules somatiques.

Les gènes BRCA1 (17q21) et BRCA2 (13q12-13)

Le gène BRCA1 (isolé par Miki *et al.* 1994) et le gène BRCA2 (isolé par Wooster *et al.* 1995) seraient responsables de 15 à 20 % des cancers du sein héréditaires (Peto *et al.*, 1999; Anglian Breast Cancer Study Group, 2000). Malgré le peu

d'homologie⁵ entre les séquences de BRCA1 et de BRCA2, ces gènes semblent posséder une fonction similaire : la réparation de l'ADN. En effet, ces deux protéines lient la protéine Rad51 responsable de la recombinaison et de la réparation de l'ADN (Scully *et al.*, 1997 ; Mizuta *et al.*, 1997). Les bras chromosomiques 17q et 13q sont fréquemment délétés dans les tumeurs du sein démontrant des mutations héréditaires des gènes BRCA1 et BRCA2 (Ingvarsson, 1999). Plus de 80 % des mutations de BRCA1 et BRCA2 mènent à des protéines tronquées par l'introduction prématurée d'un codon stop (Wooster *et al.*, 1995; Tavtigian *et al.*, 1996; Ellisen et Haber, 1998). Toutefois, les mutations des gènes BRCA1 et BRCA2 sont rares dans le cancer du sein sporadique, même dans les tumeurs démontrant la perte des bras 13q et 17q (Lancaster *et al.*, 1996; Garcia-Patino *et al.*, 1998; Miki *et al.*, 1996).

Dans un autre ordre d'idées, plusieurs syndromes génétiques héréditaires sont associés à la transmission héréditaire d'une forme inactive d'un GST :

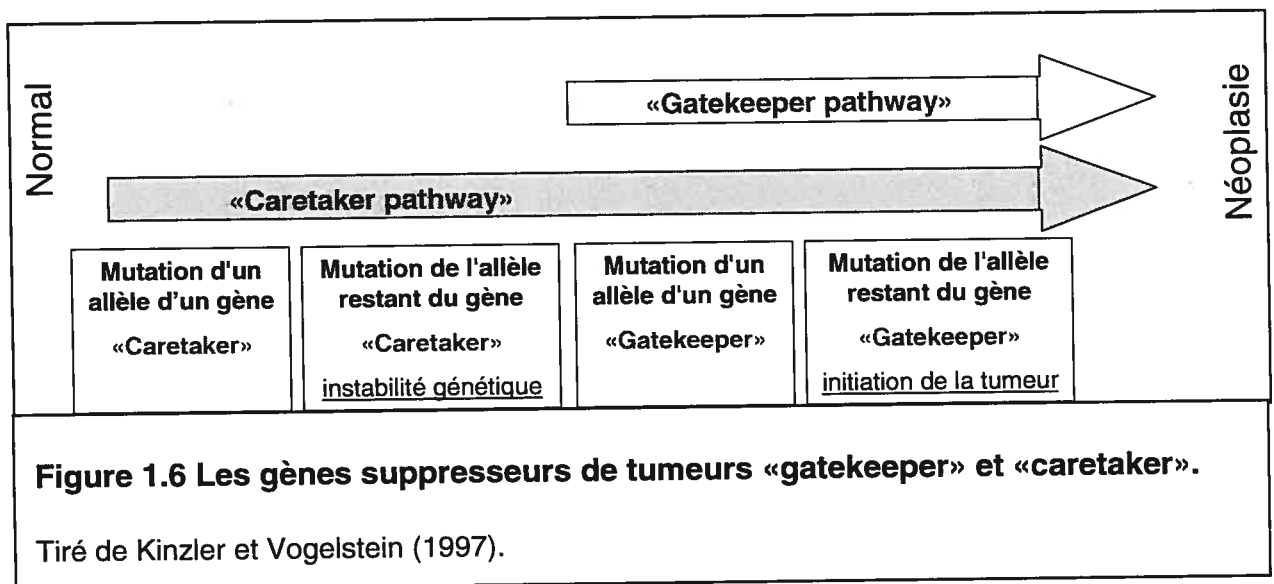
- Le syndrome de Li-Fraumeni (P53). Ce syndrome fut initialement décrit par Li et Fraumeni en 1969. La moitié des patients sont porteurs d'une mutation récessive du gène P53. Ces patients possèdent un risque approchant les 100 % de développer un cancer, particulièrement un cancer du sein (Malkin *et al.*, 1990).
- La maladie de Cowden (PTEN/MMAC1; 10q23) Cette maladie rare fut initialement décrite par Lloyd et Dennis en 1963. Plusieurs de ces patients prédisposés au cancer du sein (30 % des cas) sont porteurs d'une mutation germinale du gène PTEN (Tsou *et al.*, 1998; Lynch *et al.*, 1997). Les mutations de PTEN semblent rares dans le cancer du sein spontané (Rhei *et al.*, 1997; Ueda *et al.*, 1998). La protéine PTEN est une phosphatase impliquée dans la progression du cycle cellulaire.

La liste des GST impliqués dans le cancer du sein sporadique et héréditaire est restreinte. Les GST présentés ci-dessus ne correspondent qu'à une fraction des loci LOH identifiés jusqu'à maintenant dans les tumeurs du sein. Plusieurs loci LOH demeurent donc orphelins (Ingvarsson, 1999).

⁵ Toutefois, les gènes BRCA1 et BRCA2 possèdent tous deux un exon 11 relativement grand, qui semble crucial pour leurs fonctions.

1.3.6 La classification des gènes suppresseurs de tumeurs

La découverte d'un nombre grandissant de GST a nécessité la création d'un système de classification. Kinzler et Vogelstein (1997) ont divisé les GST en deux grandes catégories: les «gatekeeper» et les «caretaker». Les gènes «gatekeeper» (ex : Rb) freinent normalement la prolifération cellulaire et leur inhibition enclenche directement l'initiation de la tumeur (Figure 1.6). A l'inverse, l'inhibition des gènes «caretaker» (ex: BRCA1 et BRCA2) possède un effet indirect sur l'initiation de la tumeur. Les gènes «caretaker» augmentent l'instabilité génomique et le niveau de mutations, notamment au sein des gènes «gatekeeper» (Figure 1.6).



1.4 Les oncogènes

Attardons-nous maintenant aux oncogènes (du Grec *onkos*, masse ou tumeur). Par définition, un proto-oncogène est un gène qui régule de façon positive la croissance et la prolifération des cellules. Une mutation unique (amplification, translocation, mutation ponctuelle) suffit pour transformer un proto-oncogène en oncogène activé. Comparé au proto-oncogène, l'activité de l'oncogène est augmentée («gain-of-function») et s'impose à tout partenaire non-activé (Varmus, 1984).

Dans le cancer du sein, l'amplification génique est un phénomène fréquent, tandis que l'activation d'oncogènes par mutation ou translocation s'avère plus rare (van de Vijer et Nusse, 1990). Plus d'une dizaine d'oncogènes seraient impliqués dans le cancer du sein : HRAS, MYC, MDM2, ERBB2, CCND1, FGFR1, BCL2, EGFR, SRC, PLG, URK, WNT (Dankort et Muller, 2000; Alkurawa *et al.*, 2004). Le seul oncogène abordé dans ce travail sera *neu/erbB-2*, surexprimé dans les souris Tg MMTV/*neu*.

1.4.1 L'oncogène *neu* (p185/erbB2/HER2)

Au début des années 1980, le groupe de Weinberg a isolé la protéine p185 (185,000 daltons) dans des neuroblastomes induits chimiquement chez le rat (Shih *et al.*, 1981, Padhy *et al.*, 1982). La protéine p185 provient de l'oncogène *neu* (neuroblastome) et démontre certaines affinités sérologiques avec la protéine du récepteur EGF («Epidermal Growth Factor») (Schechter *et al.*, 1984). Au cours de la même décennie, le groupe de Yamamoto a identifié le gène *erbB2* dans une librairie humaine (Semba *et al.*, 1985). Ce groupe rapporte une surexpression du gène dans des adénocarcinomes des glandes salivaires humaines. De plus, ces auteurs ont distingué expérimentalement le récepteur EGF (nommée par eux *erbB1*) du gène *erbB2* (Semba *et al.*, 1985). Finalement, ces chercheurs ont observé chez le rat, une homologie entre les patrons de digestion (Southern) du gène *erbB2* et du gène *neu* (Semba *et al.*, 1985). En réalité, les gènes *erbB2* et *neu* ne représentent qu'un seul et même gène : le proto-oncogène *neu/erbB2* code pour un récepteur de facteur de croissance possédant une activité tyrosine kinase. Une mutation ponctuelle affectant le domaine transmembranaire a été découverte dans des tumeurs du rat

(Bargmann *et al.*, 1986; Bargmann et Weinberg, 1988). Cette mutation provoque une augmentation de la dimérisation et de la phosphorylation du récepteur *neu/erbB2*.

L'homologue humain du gène *neu/erbB2*, le gène ERBB2/HER2, est surexprimé dans différentes tumeurs humaines : sein, ovaire, estomac, vessie, poumon et colon (van de Vijver *et al.*, 1987). Dans les tumeurs du sein, la surexpression du gène ERBB2 survient généralement suite à une amplification d'ADN. Peu de tumeurs démontrent une surexpression du gène ERBB2 sans amplification (Bièche et Lidereau, 1995). Le gène ERBB2 est amplifié dans 20 % des tumeurs invasives du sein (Slamon *et al.*, 1987; Ali *et al.*, 1988; Tandon *et al.*, 1989; Borg *et al.*, 1991). Plus spécifiquement, ERBB2 est amplifié dans 70 % des carcinomes canaux de type *comédo-carcinome*⁶ (van de Vijver *et al.*, 1988). La surexpression fréquente du gène ERBB2 dans le *comédo-carcinome* suggère que ce sous-type de carcinome canalaire représente une entité biologique distinguée (Bièche et Lidereau, 1995). Nous verrons dans les prochaines sections que le gène *erbB2* a été surexprimé dans plusieurs modèles animaux du cancer.

1.4.2 Les modèles animaux du cancer du sein

Les recherches sur le cancer du sein ont été effectuées sur les tumeurs humaines (et lignées cellulaires dérivées) ainsi que sur les tumeurs provenant des modèles animaux. En mimant le développement des tumeurs chez l'humain, les modèles animaux permettent l'étude détaillée des différents stades de la carcinogenèse. On peut généralement inférer les informations provenant des modèles animaux aux cancers humains. Les modèles animaux possèdent comme avantages : une manipulation facile, un contrôle de l'environnement, le développement de souches bien caractérisées et l'accès à un vaste éventail d'outils adaptés à ces modèles (Thomas *et al.*, 1996; Hamilton et Frankel, 2001; Balmain 2002b). Les méthodes d'induction des tumeurs mammaires chez les modèles animaux comprennent : l'infection par le virus MMTV («Mouse Mammary Tumor Virus»), l'exposition aux carcinogènes et la création d'animaux transgéniques et «knock-out».

⁶ Le comédo-carcinome repose sur l'observation au microscope d'épithélium en prolifération et de débris nécrotiques au centre des canaux lactifères (Bloodgood, 1934).

1.4.2.1 Le virus MMTV

Un virus infectieux présent dans le lait maternel possède une forte incidence sur le développement des tumeurs mammaires affectant différentes souches de souris (Bittner 1936, 1943; Smith, 1967). Les propriétés tumorales du virus MMTV sont intimement liées à son cycle de réplication, notamment par l'insertion au hasard de l'ADN proviral dans le génome de l'hôte (Callahan et Smith, 2000). Dans les tumeurs, l'identification des domaines d'intégration du virus MMTV a permis les découvertes de nombreux oncogènes impliqués dans le cancer du sein (Callahan, 1996).

1.4.2.2 Exposition aux carcinogènes

L'exposition à certains carcinogènes provoque l'induction de tumeurs mammaires. Par exemple, une injection unique de NMU (N-nitroso-N-méthylurea) provoque chez le rat des tumeurs mammaires suite à une latence de 6 à 12 mois (van de Vijver et Nusse, 1990).

1.4.2.3 Souris «knock-out» et transgéniques

Il est maintenant possible d'activer ou d'inhiber l'expression de gènes spécifiques chez les souris et ce, de façon spatio-temporelle. À l'aide de ces méthodes, une relation causale a pu être établie entre les mutations retrouvées dans les tumeurs et le développement des tumeurs.

1.4.2.3a Modèles avec inhibition de gènes suppresseurs de tumeurs

À part quelques exceptions⁷, l'inhibition complète d'un GST provoque la mort de l'embryon (Ghebranious et Donehower, 1998). Rare sont les modèles de souris «knock-out» qui démontrent un spectre de tumeurs similaire à l'humain (Jacks, 1996). Par exemple, les souris homozygotes «knock-out» pour le gène Rb meurent après 14 jours de gestation (Clarke *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1992; Jacks *et al.*, 1992). Les souris hétérozygotes «knock-out» pour le gène Rb ne développent pas de rétinoblastome mais des adénomes de la glande pituitaire (Jacks *et al.*, 1992; Hu *et al.*, 1994). Néanmoins, ces tumeurs démontrent une perte d'hétérozygosit  au niveau de l'allèle normal en accord avec l'hypothèse de Knudson (Hu *et al.*, 1994).

⁷ Une exception notable est l'inactivation homozygote du gène p53, donnant naissance à une progéniture viable (Donehower *et al.*, 1992).

Depuis quelques années, la technologie de «knock-out» conditionnel (le système *cre-lox*) permet d'étudier en détail la fonction des GST au sein de la carcinogénèse (Kuhn *et al.*, 1995). Voici l'exemple du gène *Brcal* :

L'inactivation homozygote du gène *Brcal* (Hakem *et al.*, 1997; Ludwig *et al.*, 1997) provoque la mort de l'embryon. De plus, les souris hétérozygotes «knock-out» pour *Brcal* ne démontrent aucune prédisposition au cancer (Hakem *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1996; Ludwig *et al.*, 1997). Toutefois, l'inactivation du gène *Brcal* dans les cellules épithéliales mammaires à l'aide de la recombinaise *cre* cause la formation de tumeurs mammaires suite à une latence de plus de 10 mois (Xu *et al.*, 1999). Ainsi, la méthode *cre-lox* permet de développer des modèles murins plus représentatifs des tumeurs humaines.

1.4.2.3b Modèles avec surexpression d'oncogènes

Plusieurs modèles du cancer du sein surexpriment différents oncogènes sous le contrôle d'un promoteur spécifique aux glandes mammaires (MMTV-LTR, WAP, β -lactoglobuline, β -caséine). Dans la prochaine section, nous aborderons le modèle de souris transgénique MMTV/*neu*.

1.4.3 Les souris transgéniques MMTV/*neu*

Le groupe du Dr Muller (Muller *et al.*, 1988) et le groupe du Dr Jolicoeur (Bouchard *et al.*, 1989) ont développé des souris transgéniques surexprimant l'oncogène *neu* muté sous le contrôle du LTR du virus MMTV. Ces deux groupes ont utilisé un cDNA de *neu* comprenant la mutation décrite par Bargmann *et al.* (1986). Malgré leurs similitudes, ces modèles provoquent des phénotypes divergents. Le modèle de Muller cause des tumeurs mammaires polyclonales⁸ affectant de façon synchrone, l'ensemble des glandes mammaires mâles et femelles suite à une latence de 3 mois (Muller *et al.*, 1988). Dans ce modèle, la surexpression du cDNA de *neu* muté semble suffire («single step

⁸ Une tumeur peut se développer à partir d'une seule cellule (tumeur monoclonale), de quelques cellules (tumeur oligoclonale) ou d'un groupe de cellules (tumeur polyclonale).

transformation») au développement des tumeurs mammaires. A l'inverse, le modèle⁹ du Dr Jolicoeur engendre uniquement dans les femelles post-gestantes, des tumeurs mammaires d'origine clonales ou oligoclonales affectant au hasard et de façon asynchrone, une ou plusieurs glandes suite à une latence de 5 à 10 mois (Bouchard *et al.*, 1989). Dans le modèle du Dr Jolicoeur, la surexpression de *neu* muté semble insuffisante et des changements génétiques additionnels seraient nécessaires au développement des tumeurs mammaires. Trois hypothèses sont avancées pour expliquer ces phénotypes contradictoires : 1) les souches de souris sont différentes, 2) l'insertion aléatoire du transgène peut créer un effet positionnel, 3) il existe des différences entre les constructions des deux groupes (Bouchard *et al.*, 1989). Sur ce dernier point, le transgène de Muller *et al.* (1988) contient une séquence de 600 pb provenant du virus MSV («Murine Sarcoma Virus») pouvant influencer la transformation. Depuis, d'autres modèles de souris transgéniques MMTV/*neu* ont été développés par le groupe du Dr Muller (Guy *et al.*, 1992 ; Andrechek *et al.*, 2000). Il semble maintenant que la surexpression du transgène *neu/erbB2*, muté ou non, provoque le développement des glandes mammaires suite à une longue latence. Malgré leurs divergences, ces deux modèles (Muller *et al.*, 1988; Bouchard *et al.*, 1989) démontrent que la surexpression de l'oncogène *neu/erbB2* muté, sous le contrôle du promoteur MMTV, provoque l'apparition de tumeurs mammaires.

Les tumeurs mammaires provenant des souris MMTV/*neu* du laboratoire du Dr Jolicoeur sont majoritairement des carcinomes canaux. Ces tumeurs démontrent des calcifications et de la nécrose au centre des canaux (Bouchard *et al.*, 1989). Ce phénotype est similaire au comédo-carcinome humain. Chez l'humain, 70 % des comédo-carcinomes canaux montrent une surexpression du gène ERBB2 (van de Vijver *et al.*, 1988). Ces tumeurs infiltrantes envahissent ensuite les ganglions adjacents et font des métastases au poumon, tout comme les tumeurs humaines (Bouchard *et al.*, 1989).

⁹ Les détails concernant la construction du transgène et les croisements des souris MMTV/*neu* sont présentés à l'annexe 1.

1.5 La famille des Ephrins

Cette thèse identifie le gène EphA10, comme nouveau gène suppresseur de tumeurs candidat.

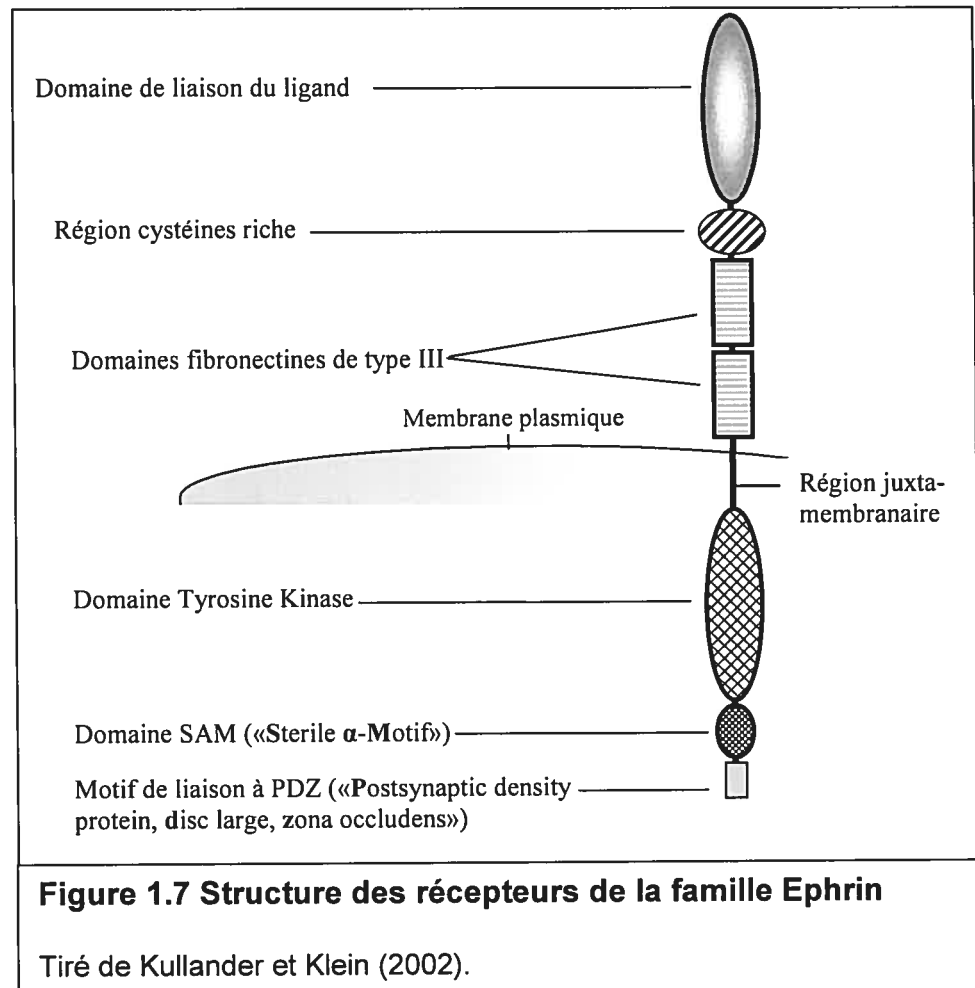
Les membres de la famille Ephrin sont impliqués dans la régulation des interactions entre cellules, principalement au niveau du système nerveux (Murai et Pasquale, 2004). Ces protéines agissent comme des agents attractifs et répulsifs à la surface des cellules. Les axones qui expriment les récepteurs Ephrins migrent loin des axones qui expriment les ligands Ephrins (Murai et Pasquale, 2004). Les protéines de signalisation qui interagissent avec les Ephrins sont impliqués dans l'adhésion des cellules, la motilité cellulaire et le réarrangement du cytosquelette. Les Ephrins interagissent notamment avec les intégrines (Kullander et Klein, 2002). L'expression des gènes Ephrins est ubiquitaire durant le développement de l'embryon, mais demeure limitée chez l'adulte.

Le nom Ephrin dérive de la lignée cellulaire «Erythropoietin-producing hepatoma cell line», d'où le premier membre de cette famille (EphA1) a été cloné (Hirai *et al.*, 1987). Avec ces 22 membres dans le génome humain, 14 récepteurs et 8 ligands, les gènes Ephrins constituent la plus grande famille tyrosine kinase du génome. Les membres de cette famille sont divisés en 2 classes selon leurs modes d'ancrage à la membrane : les membres de la classe A sont liés à la membrane par un lien glycosylphosphatidylinositol (GPI) et les membres de la classe B par un domaine transmembranaire classique. En général, les récepteurs de la classe A lient les ligands de la classe A et les récepteurs de la classe B lient les ligands de la classe B. Cependant, des interactions fonctionnelles peuvent se produire entre les membres des deux classes (Himanen *et al.*, 2004).

1.5.1 Les récepteurs Ephrins

Les récepteurs de la famille Ephrins sont nommés Eph. Les récepteurs de la classe A sont désignés EphA et ceux de la classe B, EphB. On dénombre 9 membres de type A (EphA1-8 et EphA10) et 5 membres de type B (EphB1-4 et EphB6) (Himanen et Nikolov, 2003; Murai et Pasquale, 2004). Mis à part leur mode d'ancrage à la membrane, ces deux classes de récepteurs possèdent une structure commune (Figure 1.7, page suivante). On retrouve dans la portion extra-cellulaire un domaine de liaison au ligand, une région cystéine riche et deux domaines fibronectines de type III. La portion intra-cellulaire

contient un domaine tyrosine kinase, un domaine SAM et un motif de liaison à PDZ (Himanen et Nikolov, 2003; Kullander et Klein, 2002).

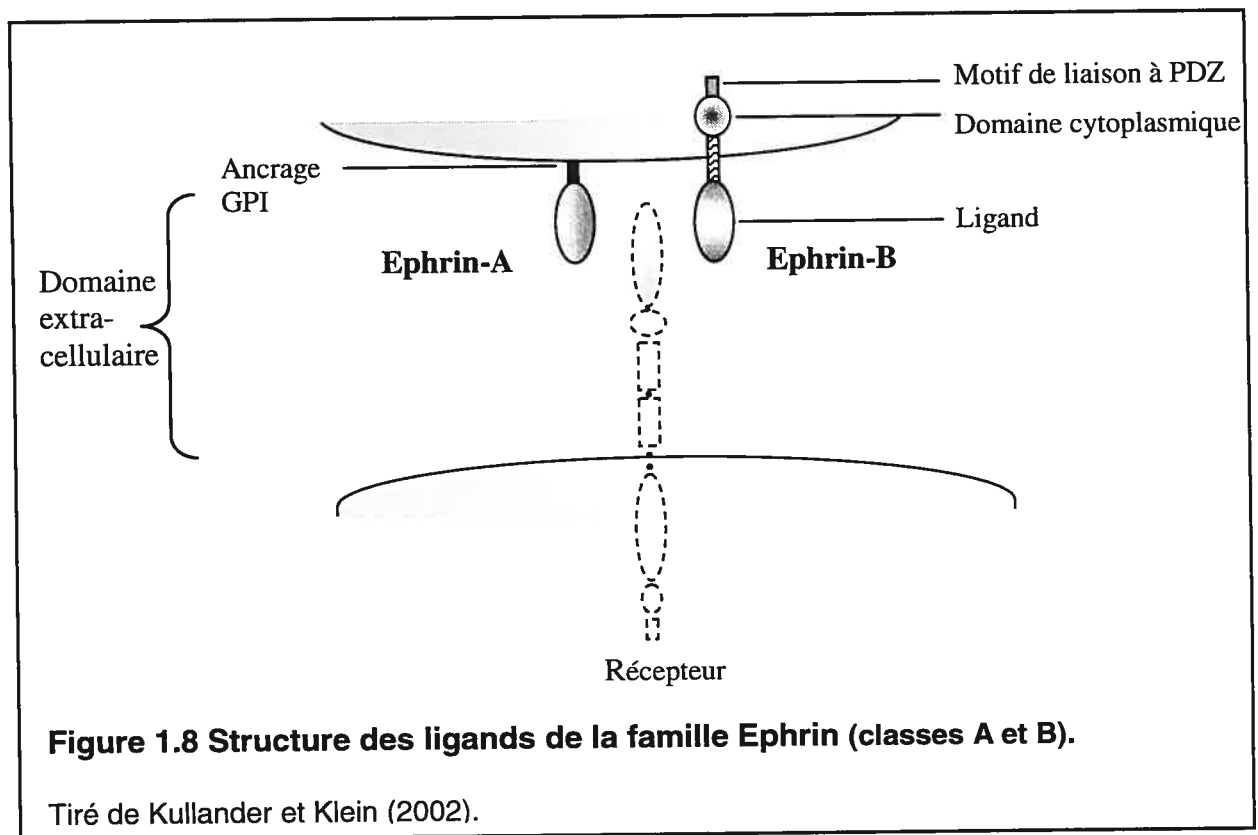


Suite à la liaison au ligand, les récepteurs Eph sont phosphorylés sur plusieurs résidus tyrosines. L'autophosphorylation des résidus tyrosines de la région juxta-membranaire semble cruciale pour activer complètement le domaine tyrosine kinase. Le domaine kinase est alors libéré de son interaction avec la région juxta-membranaire et devient actif. Ce relachement permet la liaison de plusieurs molécules de signalisation au niveau des résidus tyrosines de la région juxta-membranaire et du domaine kinase (Zisch *et al.*, 1998 ; Binns *et al.*, 2000 ; Kullander et Klein, 2002).

1.5.2 Les ligands Ephrins

Les ligands de la famille sont nommés Ephrins. Les ligands de la classe A sont désignés EphrinA et ceux de la classe B, EphrinB. Les ligands des classes A et B possèdent des structures différentes : les ligands de la classe B possèdent une région cytoplasmique alors que les ligands de la classe A en sont dépourvus (Figure 1.8).

Une propriété surprenante des membres de la famille Ephrin est leur signalement bi-directionnel : les signaux sont transmis dans la cellule du récepteur («forward signaling») mais également dans la cellule du ligand («reverse signaling») (Cowan et Henkemeyer, 2002; Davy et Soriano, 2005; Murai et Pascale, 2003). Suite à la liaison au récepteur, le domaine cytoplasmique des ligands de classe B devient phosphorylé sur différents résidus tyrosines. La phosphorylation du domaine PDZ permet la liaison à différentes protéines de signalisation (Holland *et al.*, 1996; Bruckner *et al.*, 1997). Même les ligands EphrinA, sans région cytoplasmique, pourraient transmettre un signal (Davy *et al.*, 1999).



1.5.3 Les Ephrins et le cancer

Peu d'informations sont disponibles concernant le rôle des gènes Ephrins dans le cancer. Les Ephrins influencent l'attachement des cellules en interagissant avec plusieurs molécules d'adhésion (intégrines, E-cadherin). L'expression inappropriée des gènes Ephrins pourrait augmenter le potentiel métastatique des tumeurs (Dodelet et Pasquale, 2000). Plusieurs articles relient les gènes Ephrins aux cancers :

- Les Ephrins sont surexprimés dans différents types de cancers:

EphA2 dans le cancer de la prostate (Walker-Daniels *et al.*, 1999), de la peau (Miyazaki *et al.*, 2003), du poumon (Kinch *et al.*, 2003); EphB6 dans les neuroblastomes (Tang *et al.*, 1999, 2000); EphB4 dans les tumeurs mammaires (Andres *et al.* 1994) et dans diverses lignées cellulaires du sein (MCF7, MDA MB-231, SKBR, T47D, BT20 et BT474) (Bennett *et al.*, 1994; Berclaz *et al.*, 1996). Pour un résumé exhaustif des gènes Ephrins surexprimés dans les tumeurs, consulter l'article de Surawska *et al.* (2004).

- Les Ephrins démontrent une baisse d'expression dans les tumeurs:

Une réduction drastique du niveau de la protéine EphB4 a été constatée par immunohistochimie dans 124 tumeurs du sein chez l'humain (Berclaz *et al.*, 2002). On rapporte également par immunohistochimie, une baisse du niveau de la protéine EphB6 dans 32 mélanocytes (Hafner *et al.*, 2003). Finalement, l'expression du gène EphA7 serait inhibée par méthylation dans des tumeurs colorectales (Wang *et al.*, 2005). Pour un résumé exhaustif des gènes Ephrins dont l'expression est inhibée dans les tumeurs, consulter l'article de Surawska *et al.* (2004).

- Les manipulations expérimentales apportent également des arguments en faveur de l'implication des gènes Ephrins dans le cancer :

La surexpression du gène EphA1 dans les cellules NIH3T3 provoque la formation de foci en agar et la formation de tumeurs dans les souris nues (Maru *et al.*, 1990); l'activation du gène EphA2 induit la transformation des cellules mammaires MCF-10A (Zelinski *et al.*, 2001); la surexpression de EphB2 dans les cellules U251 stimule la migration et l'invasion (Nakada *et al.*, 2004); la

surexpression du récepteur EphB4 induit la migration et la prolifération des cellules en culture (Steinle *et al.*, 2002, 2003).

En dépit des résultats corrélant la transformation cellulaire avec l'augmentation ou la baisse d'expression des membres Ephrins, le rôle des Ephrins dans le cancer demeure peu documenté. Jusqu'à tout récemment (consulter la section 5.9.3), aucun membre des Ephrins ne démontrait de mutations dans les tumeurs (Nakamoto et Bergemann, 2002; Surawska *et al.*, 2004). L'unique mutation retrouvée chez un membre des Ephrins (EphrinB1) était reliée à un syndrome craniofrontonasale (Twigg *et al.*, 2004). Finalement, la surexpression des Ephrins dans les souris transgéniques ne semble pas provoquer de tumeurs (Nakamoto et Bergemann, 2002).

1.5.4 Les Ephrins et le développement des glandes mammaires

Certains gènes Ephrins sont impliqués dans la formation et le développement des glandes mammaires. Le groupe de Ziemiecki a publié 3 articles concernant le rôle du récepteur EphB4 et de son ligand ephrinB2 dans les glandes mammaires :

- **Article 1.** Andres *et al.* (1994).

Isolation du récepteur EphB4, un nouveau membre de la famille Ephrin. L'expression de ce récepteur varie grandement durant le développement des glandes mammaires et dans certaines tumeurs mammaires.

- **Article 2.** Nikolova *et al.* (1998).

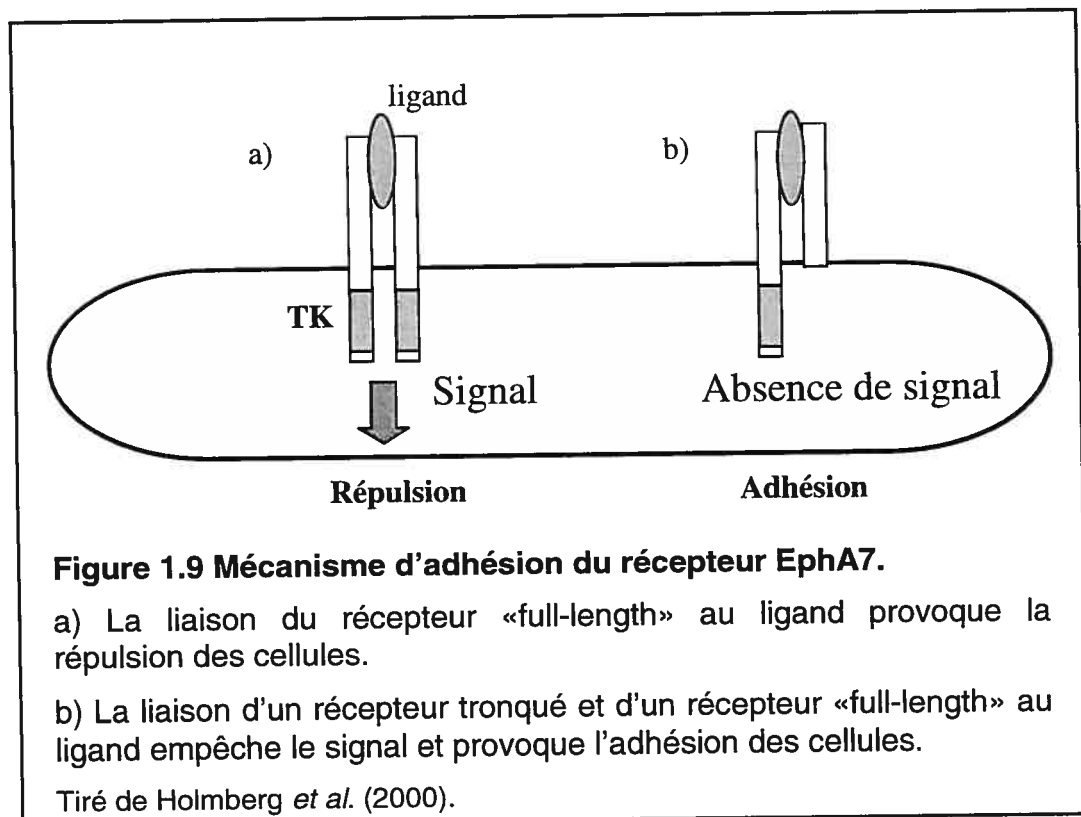
L'expression des protéines EphB4 et EphrinB2 semble fortement augmentée durant la puberté (6 semaines après la naissance) mais pratiquement inhibée durant la gestation et la lactation. De plus, les tumeurs mammaires provenant des souris transgéniques Wap-myc et Wap-ras, démontrent une perte d'expression du ligand EphrinB2 dans les stades tumorales précoces et une transition de l'expression du récepteur EphB4 des cellules myoépithéliales vers les cellules épithéliales, durant la progression tumorale.

▪ **Article 3.** Munarini *et al.* (2002).

Création d'une transgénique EphB4 sous le contrôle du promoteur MMTV. Ce promoteur est fortement exprimé durant la gestation et la lactation, périodes où la protéine EphB4 n'est pas normalement exprimée (Nicolova *et al.*, 1998). Dans ces transgéniques, les glandes mammaires en lactation les cellules épithéliales perdent contact avec les cellules voisines. Les transgéniques MMTV/EphB4 ne développent pas de tumeurs, mais le croisement des Tg MMTV/EphB4 et des Tg MMTV/*neu* réduit la latence des tumeurs mammaires provoquées par le transgène *neu/erbB2*.

1.5.5 Récepteurs Eph tronqués, sans domaine tyrosine kinase

L'adhésion cellulaire médiée par les récepteurs Ephrins s'explique dans certains cas, par l'expression d'une forme tronquée suite à un épissage alternatif de l'ARNm. Comme plusieurs récepteurs Eph, EphA7 possède 2 formes tronquées dépourvues du domaine tyrosine kinase (Ciossek *et al.*, 1995; Valenzuela *et al.*, 1995). Ces protéines tronquées agissent comme dominant-négatif sur la forme complète du récepteur EphA7, provoquant l'adhésion et l'agrégation des cellules (Figure 1.9) (Holmberg *et al.*, 2000).



CHAPITRE 2

ARTICLE 1

Fine allelotyping of mouse chr4 and 19 regions syntenic to human chr 1p and 10q in erbB2-induced mammary tumors reveals multiple discontinuous candidate regions of tumor suppressor loci.

Marc Cool[†], François Depault[†] et Paul Jolicoeur¹⁰

[†] Ces auteurs ont contribué également à ce travail.

Cet article a été accepté pour publication dans la revue :

Genes, Chromosomes and Cancer

2006 Feb;45(2):191-202.

¹⁰ Dans la présente thèse, la référence (Cool, Depault et Jolicoeur) correspond à l'article décrit sur cette page.

Avant-propos

Le laboratoire du Dr Jolicoeur a publié dans la prestigieuse revue *Cell*, un modèle murin surexprimant l'oncogène *neu/erbB2*. Les souris Tg MMTV/*neu* développent des tumeurs mammaires similaires aux tumeurs humaines suite à une longue latence, suggérant que l'oncogène *neu* ne soit pas suffisant et que d'autres gènes coopèrent avec lui pour le développement des tumeurs mammaires. Parmi les événements génétiques pouvant survenir, on compte l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (GST). Jusqu'à ce jour, la littérature rapporte l'implication d'un nombre restreint de GST dans le cancer du sein. Durant les 2 dernières décennies, la méthode LOH a facilité la découverte de plusieurs GST et ce, dans différents types de cancers. Cette méthode fut appliquée dans notre laboratoire aux tumeurs mammaires MMTV/*neu*. Une première analyse LOH fut effectuée sur 62 tumeurs MMTV/*neu* par Cool et Jolicoeur et publiée en 1999 dans la revue *Cancer Research*. Utilisant 86 marqueurs microsatellites répartis sur les 20 paires de chromosomes des tumeurs MMTV/*neu*, cet article rapporte une incidence de LOH élevée sur les chromosomes 4 (50%), 19 (32%) et 8 (21%). Le but premier de cette thèse est de compléter les travaux initiés dans le laboratoire pour découvrir de nouveaux GST candidats dans les tumeurs MMTV/*neu*. Le premier article de cette thèse localise 36 nouveaux loci LOH circonscrits le long des chromosomes 4 et 19. Pour se faire, nous avons analysé sur 93 tumeurs MMTV/*neu*, 61 marqueurs microsatellites répartis sur les chromosomes 4 et 19. Les loci LOH découverts démontrent une résolution inégalée et représentent une base solide pour la recherche de nouveaux GST. Cet article a été rédigé conjointement avec le Dr Marc Cool. Ma contribution à la production de cet article a été majeure et déterminante.

ABSTRACT

Loss of heterozygosity (LOH) at human chromosomes 1p32-36 and 10q23-26 is frequent in various human tumors, including breast cancers, and is thought to reflect the loss of tumor suppressor genes (TSG). To map such genes, a high resolution LOH analysis was performed on 93 erbB2-induced mammary tumors from (BALB/c X C57BL/6) F1 MMTV/*ErbB2* transgenic mice. A panel of 24 microsatellite markers specific to the region of mouse chr4 homologous to human 1p31-36 and 16 markers specific to the mouse chr19 region homologous to human 10q23-26 were used. In addition, a lower density mapping was performed on the remaining portion of mouse chr4 [homologous to human 9p13, 9p21-24, 9q21-22, 9q31-34 (12 markers)] and chr19 [homologous to 9q21, 9p24, 11q12-13, (9 markers)]. Several distinct, discrete and discontinuous LOH regions flanked by areas of heterozygosity were identified, 22 on chr4 and 14 on chr19. Among these, 13 were mapped in the region of homology with human 1p31-36 (between D4Mit153 and D4Mit254) and 9 in the 10q23-26 region (between D19Mit46 and D19Mit6). Although several LOH loci span a large interval, many are relatively short (1-4 Mb) and a few span an interval of <1 Mb. This allelotyping represents the highest density of LOH loci yet mapped in these chromosomal regions. The presence of numerous LOH regions in alternation with regions of heterozygosity, consistent with mitotic recombination as a mechanism for generating such a mosaic pattern, suggests the presence of several TSG in these regions and should facilitate their identification.

INTRODUCTION

Loss of heterozygosity (LOH) is a very frequent genetic event in cancer [for review, see (Levine, 1993; Sherr, 2004)]. In many instances, the LOH locus represents the physical deletion of the corresponding DNA sequences, with subsequent inactivation of the remaining allele, thus leading to the complete inactivation of both alleles and loss-of-function of the target gene at this locus. This mechanism initially proposed by Knudson (Knudson and Strong, 1972) was first uncovered in tumors from individuals with a genetic predisposition to retinoblastoma (Cavenee et al., 1983). This paradigm appears to be the molecular mechanism by which a few other tumor suppressor genes (TSG) are inactivated (Knudson, 1993; Sherr, 2004). Therefore, the presence of LOH at a given locus has been used as a tool to identify novel candidate TSG.

In primary breast carcinoma, LOH represents the most frequent mutation (van de Vijver, 1993) and affects a large number of distinct chromosomal regions (Bieche and Lidereau, 1995; Devilee and Cornelisse, 1994; Ingvarsson, 1999; Kerangueven et al., 1997), notably 1p (Imyanitov et al., 2000; Lerebours et al., 2002; Nagai et al., 1995; Tsukamoto et al., 1998; Wang et al., 2004) and 10q (Achary et al., 2003; Jones et al., 2001; Kleivi et al., 2002; Richard et al., 2000; Wang et al., 2004). These two human chromosomal segments are also the site of frequent deletions (LOH) in several other tumor types (Dong, 2001; Inda et al., 2003; Karoui et al., 2004; Knuutila et al., 1999; Qin, 2002; Saran et al., 1996; Schwab et al., 1996; Thiessen et al., 2003; Yeh et al., 1999; Zhu et al., 2004). Very few TSGs have so far been identified on human 1p32-36. However, this human chromosomal region, as well as its murine homologous region, is thought to harbor additional TSG (Lee et al., 1995; Nagai et al., 1995; Phelan et al., 1996; Radany et al., 1997; Ritland et al., 1997; Santos et al., 1996; Tsukamoto et al., 1998; Zhuang et al., 1996). The human 10q chromosome segment harbors the well-known TSG *PTEN* (Li et al., 1997; Steck et al., 1997), as well as other TSG, *MXII* (Eagle et al., 1995) and *NEURL* (Nakamura et al., 1998). However, evidence for the presence of additional TSG in this region has been provided (Achary et al., 2003; Yeh et al., 1999). Thus, although these two 1p and 10q human chromosomal regions are frequently the sites of LOH, a surprisingly small number of TSG has been identified from these regions. This very likely reflects the fact that, in

most studies, the described human LOH regions are large, thus precluding further identification of putative TSG.

Using an heterozygous (BALB/c X C57BL/6) F1 MMTV/*ErbB2* transgenic (Tg) mouse model of mammary tumors in which the activated *erbB2/neu* oncogene is expressed with the mouse mammary tumor virus (MMTV) long terminal repeats (LTR), we previously reported the presence of nine regions of LOH (designated Naad1 to 9, for neu-associated allelic deletion) in these tumors, using a PCR-based detection of genome-wide microsatellite analysis (Cool and Jolicoeur, 1999). These LOH^{new} were mainly detected on three chromosomes (chr4, 8 and 19), at a relatively high frequency. In an effort to identify novel putative TSG^s which may reside in the LOH regions previously identified, we focused our efforts on two LOH regions, Naad4 and Naad7, respectively on chromosome 4 and 19 and previously found to be present in a high proportion of these *erbB2*-induced Tg mammary tumors. These regions are homologous to, respectively, human chromosome 1p32-36 and 10q23-26, which are known to be the sites of frequent LOH in human breast tumors (Achary et al., 2003; Imyanitov et al., 2000; Jones et al., 2001; Kleivi et al., 2002; Lerebours et al., 2002; Nagai et al., 1995; Richard et al., 2000; Tsukamoto et al., 1998; Wang et al., 2004). Since TSG identification is facilitated by narrowing down the LOH region of interest to a shorter interval in as many informative tumors as possible, a higher resolution allelotyping was performed. A larger number of *erbB2/neu*-induced tumors (n=93) were studied with several additional microsatellite markers within and around the Naad4 (on chromosome 4) and Naad7 (on chromosome 19) LOH regions with emphasis on the distal chromosome regions. We show here that the Naad4 and Naad7 loci represent in fact several, distinct, smaller, and discontinuous LOH regions bordered by regions of heterozygosity. Moreover, we could identify, for the first time in these chromosomal regions, a few LOH sites with intervals shorter than 1 Mb, and many others with <3 Mb intervals.

MATERIAL AND METHODS

Tumors and DNA samples

The mammary tumors were all derived from the (BALB/c X C57BL/6) F1 MMTV/*ErbB2* Tg females (line Mn-10), as described previously (Cool and Jolicoeur, 1999). A total of 93 mammary tumors, including the 62 previously analyzed (Cool and Jolicoeur, 1999), were studied in the present work. DNAs were extracted from mammary tumors and from the kidney of the same animal, as described previously (Cool and Jolicoeur, 1999).

PCR-based microsatellite markers

A PCR-based assay with primers flanking microsatellites repeats (Dietrich et al., 1994; Dietrich et al., 1996) was used to detect LOH. A total of 36 and 25 polymorphic markers for the BALB/c and C57BL/6 alleles were used to assess LOH of chr4 and chr19, respectively. The position of these markers on the mouse genome was confirmed on the UCSC database (Build 33 assembly by NCBI) (up to Sept. 2004). The list of these markers is shown in Fig. 2.2 and 2.4. Primer oligonucleotides were obtained from Research Genetics (Huntsville, AL). PCR amplification was performed with one of the primers ("forward" primer) labeled with [γ - 32 P] ATP (Amersham), as described previously (Cool and Jolicoeur, 1999). The PCR reaction (10 μ l volume) contained 20 ng of genomic DNA, 0.05 μ M of 32 P-labeled "forward" primer, 0.05 μ M unlabeled reverse primer; 200 μ M each dATP, dCTP, dGTP and dTTP, 1.25 unit Taq polymerase (Pharmacia) and 1X PCR buffer [10 μ M Tris-HCl (pH8.3), 50 μ M KCl and 1.5-2.5 μ M MgCl₂]. Amplification was performed on a Perkin-Elmer 9600 instrument at 94°C for 3 min, then 25 cycles at 94°C for 15s, 55°-60°C for 2 min, 72°C for 2 min and finally 72°C for 7 min.

Analysis of LOH

This analysis was performed as previously described (Cool and Jolicoeur, 1999). Loading buffer (2X) (0.08% bromophenol blue, 0.08% xylene cyanol, and 10% glycerol) was added to amplified PCR mix reaction. Samples (5 μ l) were loaded on a 6% non-denaturing PAGE and run in 1 X TBE buffer. Each sample was always compared with its normal DNA (kidney) extracted from the same animal. The assessment of allelic loss

(LOH) was, performed for most (43/51) new marker studied with Storage Phosphor Screens (Molecular Dynamics) followed by detection with the Storm PhosphoImager (Molecular Dynamics). Only tumors showing $\geq 40\%$ decrease in intensity of one of the allele fragment was scored as positive for LOH. At least 2 assays were done to confirm LOH and their heterozygote flanking regions. The overall rate of LOH was calculated as the number of tumors with LOH over the number of all informative tumors. A number of non-informative markers were present most likely resulting from a lack of total inbreeding within the BALB/c background from the initial (C3H X C57BL/6) F2 mouse founder. The final breeding (BALB/c X C57BL/6) F1 used in our study had therefore some C57BL/6 homozygous loci.

LOH Nomenclature

The LOH regions previously identified in the erbB2/neu-induced mammary tumors were designated Naad1 to 9 for neu-associated allelic deletion (Cool and Jolicoeur, 1999). The numbers used were random and did not refer to the chromosomal mapping of the LOH region. We have adopted here a nomenclature similar to that of the MIT-derived microsatellite nomenclature which refers to the chromosome number (Dietrich et al., 1994). Therefore, the first number following Naad will be that of the chromosome location of the LOH, followed by the number of the LOH region itself. The previously described Naad1 to 5 on chr4 are now referred as Naad4-1 to Naad4-5; the Naad6 and 7 on chr19 are now referred to Naad19-1 and Naad19-2, respectively, while Naad8 and 9 on chr8 will become Naad8-1 and Naad8-2, respectively. All these previously described LOH sites were assessed by autoradiographic films with the slightly different criteria (LOH defined as $\geq 50\%$ allele loss) (Cool and Jolicoeur 1999).

Statistical Analysis

Correlation for the presence of a given LOH with another one in the same tumor was performed with the χ^2 -test. Strain bias was observed to deviate from the expected 50% distribution and was confirmed by a χ^2 statistical test.

RESULTS

LOH in regions of chr4 is a frequent event in erbB2/neu-induced mammary tumors

In our previous study involving allelotyping with six microsatellite markers on 62 mammary tumors, we could identify 5 discrete LOH regions (Naad 1 to 5, now designated Naad4-1 to 5) on chr4, all flanked by regions of heterozygosity. We extended this analysis on a larger number of tumors ($n = 93$) and with several additional microsatellite markers (total: 36) distributed across chr4. The data from the PCR analysis (Fig. 2.1) are summarized in Fig. 2.2. Discrete LOH regions that were defined by a single heterozygous marker are presented in Fig. 2.1b with the most relevant informative marker/tumor results. As shown, out of 93 tumors analyzed, 26 (28%) showed LOH on the entire chromosome. Among the tumors, which did not present evidence of such an extensive chromosomal loss, a large proportion (48/74; 65%) shows LOH at several markers. The proportion of LOH detected with each marker, including in tumors having lost the whole chromosome, varied between 12 and 56%, as indicated (Fig. 2.2).

Our work on chr4 was mainly focused in the region of homology with human 1p31-36 (between marker D4Mit153 and D4Mit254), with the use of 24 microsatellite markers to cover this region. Interestingly, LOH was detected in this region in a large proportion of tumors (61/93; 66%). The other region of chr4 homologous with human chromosome 9p13, 9p21-24, 9q21-22 and 9q31-34 (between markers D4Mit236 and D4Mit145) studied with 12 microsatellite markers, also showed frequent LOH in 63 out of 93 (68%) of tumors. These results are consistent with the frequent LOH of 1p32-36 and 9p21 described in human tumors, including in breast cancers (Schwab et al., 1996).

Multiple discontinuous LOH in regions of chr4 from erbB2/neu-induced mammary tumors

Further analysis of the allelotyping data of chr4 revealed the presence of several discrete and independent LOH regions (Naad4-6 to 16) intercepted by regions of heterozygosity (Fig. 2.3). Several of these LOH regions mapped in the portion of the chromosome, which is homologous to human chr 1p32-36. Each of these discrete LOH regions could be observed in more than one tumor. Only a few LOH sites significantly overlapped (Naad4-6 with 4-7, as well as Naad4-7, with 4-8), suggesting they may represent the loss of the same TSG. A strong bias of allelic loss (C57BL/6 vs. BALB/c) could be observed: out of 70 tumors with LOH on chr4, 45 (48%) showed deletion of the BALB/c allele while only 25 (27%) had the C57BL/6 allele deleted. This represents a significant difference from the expected 50:50 distribution (χ^2 test, $p < 0.006$). The size of each of these LOH regions was estimated to be between 10 to 25 Mb (Naad4-7, Naad4-8, Naad4-9, Naad4-16), 4 to 10 Mb (Naad4-11, Naad4-14, Naad4-15), 1 to 4 Mb (Naad4-6, Naad4-10, Naad4-12) and ≤ 1 Mb (Naad4-13). Among these, the Naad4-12 and Naad4-13 LOH regions are of special interest for their relatively small size: 1,100 and 800 kbp, respectively. They also appear to harbor a relatively small number of genes ($n=19$ and 9, respectively) (www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview).

note: win at each locus?

We extended this analysis to include additional LOH regions, which were each present only in a single tumor. These were designated Naad4-17 to 27 (Fig. 2.3b). Among these infrequently targeted LOH sites, some span relatively small intervals of 0.6 to 4 Mb (Naad4-20, Naad4-21, Naad4-24). In addition, Naad4-24 is interesting, since it covers an even shorter interval each (600 kbp) and contains only 14 genes. Although infrequently involved in LOH, these regions may still harbor important TSG.

Therefore, these data show that discontinuous LOH within chr4, including in its region of homology with human 1p32-36, is a characteristic of a large number of erbB2-induced mammary tumors.

LOH in regions of chr19 is frequent in erbB2/neu-induced mammary tumors

A similar study was performed on the 93 erbB2/neu-induced mammary tumors around the previously described (Cool and Jolicoeur, 1999) Naad19-1 and Naad19-2 loci (formerly Naad6 and 7) on chr19, a region homologous to human chromosome 9q21, 9p24, 11q12-13 and to 10q23-26 using 21 additional microsatellite markers (total: 25). This analysis showed that several tumors (26/93, 28%) present a loss of the entire chromosome. The proportion of LOH at each marker, including in tumors having lost the whole chromosome, varied between 8-63%, as indicated (Fig. 2.4). LOH in the region of homology with human 10q23-26 (between the markers D19Mit46 and D19Mit6) was observed in a large percentage of tumors (57/93; 61%). Similarly, LOH in the region of homology with human chromosome 11q12-13 (between the markers D19Mit93 and D19Mit61) was detected at high frequency (56/93, 60%). These results in murine tumors are reminiscent of the frequent LOH of 10q23-26 and 11q12-13 detected at moderate frequency in breast tumors (Achary et al., 2003; Jones et al., 2001; Kleivi et al., 2002; Richard et al., 2000; Wang et al., 2004) and frequently in other types of human tumors (Karoui et al., 2004; Qin, 2002).

Multiple discontinuous LOH in regions of chr19 from erbB2/neu-induced mammary tumors

A more detailed analysis of the LOH data of chr19 revealed the presence of additional discrete and independent LOH regions (Naad19-3 to 10) intercepted by regions of heterozygosity (Fig. 2.5). Each of these independent LOH regions could be observed in more than one tumor. As in chr4, a strong bias of allelic loss [C57BL/6, 51 out of 93 tumors (55%) vs. BALB/c, 13 out of 93 tumors (14%)] was documented for this chromosome (χ^2 test, $p < 0.0001$). The size of these LOH regions varies between 4 to 9 Mb (Naad19-5, Naad19-7), 2.5 to 4 Mb (Naad19-4, Naad19-6, Naad19-10), 1 to 2.5 Mb (Naad19-3, Naad19-9) and <1 Mb (Naad19-8). Among these, the Naad19-3, and Naad19-8 LOH regions are interesting for their small size, and Naad19-9 is remarkable, apparently containing a very small number of genes ($n=5$) despite its length (2.2 Mb).

This analysis also revealed additional discrete and independent LOH sites (Naad19-11 to 16) present in only one tumor (Fig. 2.5b). Two of these (Naad19-14 and Naad19-15) are potentially interesting for their small size (1.1 Mb, each) and for their low number of genes (~ 20). Some of the LOH sites are overlapping (Naad19-3 with Naad19-11, Naad19-4 with 19-12, Naad19-5 with 19-6, Naad19-9 with 19-8, as well as Naad19-10 with 19-9 and 19-14) and may represent the same mutational event.

These results show that, in erbB2/neu-induced mammary tumors, a large number of independent LOH events, having small intervals, occur in the portion of the murine chr19 homologous to human 10q23-26, 11q12-13, 9q21 and 9p24.

DISCUSSION

We searched for the presence of LOH in mammary tumors of (C57BL/6 X BALB/c) F1 MMTV/*ErbB2* Tg mice; in order to identify genomic regions susceptible to harbor TSG possibly collaborating for tumor formation with the *erbB2/neu* activated oncogene. Our study focused on two chromosomal regions on chr4 and 19, which were chosen for their potential interest in encoding putative TSG, as they have been shown to be the site of frequent LOH in human tumors. One of the two regions covers sequences of mouse chr4 homologous to human chromosome 1p32-36, while the other involves part of mouse chr19 homologous to human chromosome 10q23-26. At both of these sub-regions, we used a relatively large number of microsatellite markers, 24 on chr4 and 16 on chr19. Our results show that LOH is a very frequent mutational event within these regions, affecting respectively 66% and 61% of the tumors. These data are consistent with the frequent LOH reported for these genomic regions in various human tumors (see Introduction).

Interestingly, our high density mapping shows the presence of multiple, independent LOH sites within each of these chromosomal regions, suggesting that accumulation of several independent genetic events within these LOH regions contributes to tumor formation. If the LOH occurring in these regions of murine tumors is a model for what is happening in human tumors, it may be anticipated that similarly, multiple and restricted LOH sites will also be uncovered in human tumors within the homologous human chromosome 1p32-36 and 10q23-26 regions. Such similar discrete, multiple independent LOH sites have in fact previously been described in human tumors (Jakobovitz et al., 1996; Kim et al., 1997; Waber et al., 1997; Walker et al., 2004; Wistuba et al., 2000), including in human breast carcinoma (Kerangueven et al., 1997; Wang et al., 2004) and suggested to be the mutational signature of oxidative damages (Turker et al., 1999).

Not unexpectedly, some of the multiple LOH regions identified here correspond to previously described LOH sites, some spanning a shorter interval. The Naad19-4 (3.2 Mb) LOH region appears to be a shorter locus region within the Pas3 LOH site (30 Mb) (Devereux et al., 1994; Festing et al., 1994; Manenti et al., 1995), and also within the Tlyr1 region (21 Mb) bordered by the D19Mit28 and D19Mit82 markers (Santos et al., 2002).

The Tlsr8 LOH region (Santos et al., 2001) appears to correspond to Naad19-13 (14 Mb). LOH locus (Loh3) on chr4 (Radany et al., 1997) appears to contain at least 2 independent LOH sites (Naad4-16 and Naad4-27). The Lci LOH site (2 cM) (Lee et al., 1995) seems to include three independent shorter LOH regions: Naad4-12 (1.1 Mb), Naad4-13 (0.8 Mb) and Naad4-24 (0.6 Mb). Finally, the Tlsr3 LOH site (Santos et al., 1998) (8 Mb) appears to correspond to the Naad4-14 region (5 Mb). In addition, we found that some of the best characterized TSGs mapping in the regions studied are located within a LOH region identified here: *Cdkn2a* and *Cdkn2b* (Debniak et al., 2004; Krug et al., 2002) within Naad4-11, and *Pten* (Li et al., 1997; Steck et al., 1997) within Naad19-13. This latter finding represents internal validation controls for the LOH approach in this system. In addition, these results suggest that several TSG may be inactivated in some human tumors showing LOH at 9p21-22 or 10q23-25, respectively, as already proposed (Waber et al., 1997; Yeh et al., 1999).

In previous studies on multiple, discrete LOH sites concentrated on a restricted chromosomal region (Wistuba et al., 2000) and in the present work, it was found that the frequency of LOH, at some of these independent LOH regions, was relatively low (~1.5%), although it reached significant higher levels (~10%) at other sites. The detection of several independent genetic events occurring at these frequencies makes the task of identifying putative TSG more difficult. This may explain the relatively low numbers of TSG identified to date in human tumors, in regions of frequent LOH. However, although it cannot be excluded that some of these relatively infrequent genetic events occur stochastically and are biologically neutral, they are unlikely to be random and they most probably reflect mutations favoring tumor growth and being selected for during tumor expansion. These LOH events most likely represent the loss of TSG, according to Knudson's 2-hit model (Knudson, 1975). Therefore, since many of the numerous restricted LOH regions newly identified here do not harbor known TSG, there is a reasonable probability that additional and novel TSG can be identified in these regions.

Towards this goal, it is worth noticing that we have identified here the smaller LOH sites [Naad4-12 (1.1 Mb), Naad4-13 (800 kbp) and Naad19-8 (700 kbp)] yet described in these regions for the mouse chr4 or 19 and for their human homologous 1p34-36 and 10q24-25 regions. Their small sizes make them amenable for studies with molecular

approaches. In addition, the small overlapping regions observed between some of these LOH sites may be instrumental in narrowing down putative candidate TSG.

One intriguing and surprising result emerging from this study is the presence of a mosaic pattern of LOH in alternance with regions of heterozygosity present in some individual tumors. This pattern was observed in both chromosomal regions studied and was accompanied, in some tumors, by retention of both parental alleles. The molecular basis for the generation of such a mosaic pattern is unlikely to represent multiple deletions of relatively short DNA genomic sequences occurring along the chromosome, but is rather most consistent with mitotic recombination (Tischfield, 1997; Tischfield and Shao, 2003). Mitotic recombination is a frequent event in normal cells, and has been found to account for most of the LOH observed in normal T-lymphocytes or fibroblasts at the *APRT* locus (Gupta et al., 1997; Shao et al., 1999; Wijnhoven et al., 1998) and in small intestinal epithelial cells at the *Galgt2* locus (Winton et al., 1988). It is also the postulated mechanisms of LOH in tumors (Hong et al., 2002; Jordanova et al., 2002; Kruzelock et al., 1997; Rousseau-Merck et al., 1999), including in mouse mammary tumors (Blackburn et al., 2004) [reviewed in (Bishop and Schiestl, 2003)]. Moreover, high mitotic recombination with increased rate of LOH and enhanced predisposition to cancer is one of the consequences of a loss-of-function of the *Bloom* gene (Luo et al., 2000). Our data extends these findings to murine mammary tumors in two specific chromosomal regions of the genome.

In conclusion, our data show that regions of mouse chromosome homologous to human 1p32-36 and 10q23-26 are the sites of frequent mutational events in erbB2/neu-induced mammary tumors. These mutations involve numerous discrete LOH regions constituting sub-regions of large LOH regions previously identified. At least nine of these discrete LOH sites cover a 3 to 5 Mb, three extend from 1 to 2 Mb and interestingly two span an interval equal or less than 0.8 Mb. This represents the highest number of discrete small LOH regions yet identified at these chromosomal loci. The numerous genes encoded within these LOH regions need to be studied to determine whether they encode candidate TSG.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants to Paul Jolicoeur from the Canadian Breast Cancer Research Alliance (CBCRA). We thank Benoît Laganière for excellent technical assistance. We are grateful to Rita Gingras and Monique Villani for preparing the manuscript.

REFERENCES

- Achary PM, Zhao H, Fan Z, Gogineni S, Pulijaal VR, Herbst L, Mahadevia PS, Jones JG, Klinger HP, Vikram B.** (2003). A candidate metastasis-associated DNA marker for ductal mammary carcinoma. *Breast Cancer Research* **5**:R52-R58.
- Bieche I, Lidereau R.** (1995). Genetic alterations in breast cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer* **14**:227-251.
- Bishop AJ, Schiestl RH.** (2003). Role of homologous recombination in carcinogenesis. *Experimental and Molecular Pathology* **74**:94-105.
- Blackburn AC, McLary SC, Naeem R, Luszcz J, Stockton DW, Donehower LA, Mohammed M, Mailhes JB, Soferr T, Naber SP, Otis CN, Jerry DJ.** (2004). Loss of heterozygosity occurs via mitotic recombination in Trp53[±] mice and associates with mammary tumor susceptibility of the BALB/c strain. *Cancer Research* **64**:5140-5147.
- Cavenee WK, Dryja TP, Phillips RA, Benedict WF, Godbout R, Gallie BL, Murphree AL, Strong LC, White RL.** (1983). Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* **305**:779-784.
- Cool M, Jolicoeur P.** (1999). Elevated frequency of loss of heterozygosity in mammary tumors arising in mouse mammary tumor virus/neu transgenic mice. *Cancer Research* **59**:2438-2444.
- Debniak T, Gorski B, Scott RJ, Cybulski C, Medrek K, Zowocka E, Kurzawski G, Debniak B, Kadny J, Bielecka-Grzela S, Maleszka R, Lubinski J.** (2004). Germline mutation and large deletion analysis of the CDKN2A and ARF genes in families with multiple melanoma or an aggregation of malignant melanoma and breast cancer. *International Journal of Cancer* **110**:558-562.
- Devereux TR, Wiseman RW, Kaplan N, Garren S, Foley JF, White CM, Anna C, Watson MA, Patel A, Jarchow S, Maronpot RR, Anderson MW.** (1994). Assignment of a locus for mouse lung tumor susceptibility to proximal chromosome 19. *Mamm genome* **5**:749-755.
- Devilee P, Cornelisse CJ.** (1994). Somatic genetic changes in human breast cancer. *Biochimica Biophysica Acta* **1198**:113-130.
- Dietrich WF, Miller J, Steen R, Merchant MA, Damron-Boles D, Husain Z, Dredge R, Daly MJ, Ingalls KA, O'Connor TJ, Evans CA, DeAngelis MM, Levinson DM, Kruglyak L, Goodman N, Copeland NG, Jenkins NA, Hawkins TL, Stein L, Page DC, Lander ES.** (1996). A comprehensive genetic map of the mouse genome. *Nature* **380**:149-152.
- Dietrich WF, Miller JC, Steen RG, Merchant M, Damron D, Nahf R, Gross A, Joyce DC, Wessel M, Dredge RD, Marquis A, Stein LD, Goodman N, Page DC, Lander ES.** (1994). A genetic map of the mouse with 4,006 simple sequence length polymorphisms. *Nature Genetics* **5**:220-245.

Dong JT. (2001). Chromosomal deletions and tumor suppressor genes in prostate cancer. *Cancer Metastasis Review* **20**:173-193.

Eagle LR, Yin X, Brothman AR, Williams BJ, Atkin NB, Prochownik EV. (1995). Mutation of the *MXI1* gene in prostate cancer. *Nature Genetics* **9**:249-255.

Festing MF, Yang A, Malkinson AM. (1994). At least four genes and sex are associated with susceptibility to urethane-induced pulmonary adenomas in mice. *Genetical Research* **64**:99-106.

Gupta PK, Sahota A, Boyadjiev SA, Bye S, Shao C, O'Neill JP, Hunter TC, Albertini RJ, Stambrook PJ, Tischfield JA. (1997). High frequency in vivo loss of heterozygosity is primarily a consequence of mitotic recombination. *Cancer Research* **57**:1188-1193.

Hong DP, Kubo K, Tsugawa N, Mori N, Umesako S, Song CW, Okumoto M. (2002). Generation of large homozygous chromosomal segments by mitotic recombination during lymphomagenesis in F1 hybrid mice. *Journal Radiation Research (Tokyo)* **43**:187-194.

Imyanitov EN, Togo AV, Suspitsin EN, Grigoriev MY, Pozharisski KM, Turkevich EA, Hanson KP, Hayward NK, Chenevix-Trench G, Theillet C, Lavin MF. (2000). Evidence for microsatellite instability in bilateral breast carcinomas. *Cancer Letters* **154**:9-17.

Inda MM, Fan X, Munoz J, Perot C, Fauvet D, Danglot G, Palacio A, Madero P, Zazpe I, Portillo E, Tunon T, Martinez-Penuela JM, Alfaro J, Eiras J, Bernheim A, Castresana JS. (2003). Chromosomal abnormalities in human glioblastomas: gain in chromosome 7p correlating with loss in chromosome 10q. *Molecular Carcinogenesis* **36**:6-14.

Ingvarsson S. (1999). Molecular genetics of breast cancer progression. *Seminar Cancer Biology* **9**:277-288.

Jakobovitz O, Nass D, DeMarco L, Barbosa AJ, Simoni FB, Rechavi G, Friedman E. (1996). Carcinoid tumors frequently display genetic abnormalities involving chromosome 11. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **81**:3164-3167.

Jones C, Damiani S, Wells D, Chaggar R, Lakhani SR, Eusebi V. (2001). Molecular cytogenetic comparison of apocrine hyperplasia and apocrine carcinoma of the breast. *American Journal of Pathology* **158**:207-214.

Jordanova ES, Riemersma SA, Philipppo K, Giphart-Gassler M, Schuurin E, Kluin PM. (2002). Hemizygous deletions in the HLA region account for loss of heterozygosity in the majority of diffuse large B-cell lymphomas of the testis and the central nervous system. *Genes, Chromosomes and Cancer* **35**:38-48.

Karoui M, Tresallet C, Julie C, Zimmermann U, Staroz F, Brams A, Muti C, Boulard C, Robreau AM, Puy H, Malafosse R, Penna C, Pruvot FR, Thierry JP, Boileau C, Rougier P, Nordlinger B, Radvanyi F, Franc B, Hofmann-Radvanyi H. (2004). Loss of heterozygosity on 10q and mutational status of *PTEN* and *BMPR1A* in colorectal primary tumours and metastases. *British Journal of Cancer* **90**:1230-1234.

Kerangueven F, Noguchi T, Coulier F, Allione F, Wargnietz V, Simony-Lafontaine J, Longy M, Jacquemier J, Sobol H, Eisinger F, Birnbaum D. (1997). Genome-wide search for loss of heterozygosity shows extensive genetic diversity of human breast carcinomas. *Cancer Research* **57**:5469-5474.

Kim SK, Ro JY, Kemp BL, Lee JS, Kwon TJ, Fong KM, Sekido Y, Minna JD, Hong WK, Mao L. (1997). Identification of three distinct tumor suppressor loci on the short arm of chromosome 9 in small cell lung cancer. *Cancer Research* **57**:400-403.

Kleivi K, Lothe RA, Heim S, Tsarouha H, Kraggerud SM, Pandis N, Papadopoulou A, Andersen J, Jakobsen KS, Teixeira MR. (2002). Genome profiling of breast cancer cells selected against in vitro shows copy number changes. *Genes, Chromosomes and Cancer* **33**:304-309.

Knudson AG. (1993). Antioncogenes and human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**:10914-10921.

Knudson AG. (1975). The genetics of childhood cancer. *Cancer* **35**:1022-1026.

Knudson AG, Strong LC. (1972). Mutation and cancer: neuroblastoma and pheochromocytoma. *American Journal Human Genetics* **24**:514-532.

Knuutila S, Aalto Y, Autio K, Bjorkqvist AM, El Rifai W, Hemmer S, Huhta T, Kettunen E, Kiuru-Kuhlefelt S, Larramendy ML, Lushnikova T, Monni O, Pere H, Tapper J, Tarkkanen M, Varis A, Wasenius VM, Wolf M, Zhu Y. (1999). DNA copy number losses in human neoplasms. *American Journal of Pathology* **155**:683-694.

Krug U, Ganser A, Koeffler HP. (2002). Tumor suppressor genes in normal and malignant hematopoiesis. *Oncogene* **21**:3475-3495.

Kruzelock RP, Murphy EC, Strong LC, Naylor SL, Hansen MF. (1997). Localization of a novel tumor suppressor locus on human chromosome 3q important in osteosarcoma tumorigenesis. *Cancer Research* **57**:106-109.

Lee GH, Ogawa K, Nishimori H, Drinkwater NR. (1995). Most liver epithelial cell lines from C3B6F1 mice exhibit parentally- biased loss of heterozygosity at the Lci (Liver cell immortalization) locus on chromosome 4. *Oncogene* **11**:2281-2287.

Lerebours F, Bertheau P, Bieche I, Driouch K, de The H, Hacene K, Espie M, Marty M, Lidereau R. (2002). Evidence of chromosome regions and gene involvement in inflammatory breast cancer. *International Journal of Cancer* **102**:618-622.

Levine AJ. (1993). The tumor suppressor genes. *Annual Review of Biochemistry* **62**:623-651.

Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliaresis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R. (1997). PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* **275**:1943-1947.

Luo G, Santoro IM, McDaniel LD, Nishijima I, Mills M, Youssoufian H, Vogel H, Schultz RA, Bradley A. (2000). Cancer predisposition caused by elevated mitotic recombination in Bloom mice. *Nature Genetics* **26**:424-429.

Manenti G, De Gregorio L, Gariboldi M, Dragani TA, Pierotti MA. (1995). Analysis of loss of heterozygosity in murine hepatocellular tumors. *Molecular Carcinogenesis* **13**:191-200.

Nagai H, Negrini M, Carter SL, Gillum DR, Rosenberg AL, Schwartz GF, Croce CM. (1995). Detection and cloning of a common region of loss of heterozygosity at chromosome 1p in breast cancer. *Cancer Research* **55**:1752-1757.

Nakamura H, Yoshida M, Tsuiki H, Ito K, Ueno M, Nakao M, Oka K, Tada M, Kochi M, Kuratsu J, Ushio Y, Saya H. (1998). Identification of a human homolog of the *Drosophila* neuralized gene within the 10q25.1 malignant astrocytoma deletion region. *Oncogene* **16**:1009-1019.

Phelan CM, Larsson C, Baird S, Futreal PA, Rutledge MH, Morgan K, Tonin P, Hung H, Korneluk RG, Pollak MN, Narod SA. (1996). The human mammary-derived growth inhibitor (MDGI) gene: genomic structure and mutation analysis in human breast tumors. *Genomics* **34**:63-68.

Qin LX. (2002). Chromosomal aberrations related to metastasis of human solid tumors. *World Journal Gastroenterology* **8**:769-776.

Radany EH, Hong K, Kesharvarzi S, Lander ES, Bishop JM. (1997). Mouse mammary tumor virus/v-Ha-ras transgene-induced mammary tumors exhibit strain-specific allelic loss on mouse chromosome 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**:8664-8669.

Richard F, Pacyna-Gengelbach M, Schluns K, Fleige B, Winzer KJ, Szymas J, Dietel M, Petersen I, Schwendel A. (2000). Patterns of chromosomal imbalances in invasive breast cancer. *International Journal of Cancer* **89**:305-310.

Ritland SR, Rowse GJ, Chang Y, Gendler SJ. (1997). Loss of heterozygosity analysis in primary mammary tumors and lung metastases of MMTV-MTAg and MMTV-neu transgenic mice. *Cancer Research* **57**:3520-3525.

Rousseau-Merck MF, Versteeg I, Legrand I, Couturier J, Mairal A, Delattre O, Aurias A. (1999). hSNF5/INI1 inactivation is mainly associated with homozygous deletions and mitotic recombinations in rhabdoid tumors. *Cancer Research* **59**:3152-3156.

Santos J, Herranz M, Fernandez M, Vaquero C, Lopez P, Fernandez-Piqueras J. (2001). Evidence of a possible epigenetic inactivation mechanism operating on a region of mouse chromosome 19 in gamma-radiation-induced thymic lymphomas. *Oncogene* **20**:2186-2189.

Santos J, Herranz M, Perez dC, I, Pellicer A, Fernandez-Piqueras J. (1998). A new candidate site for a tumor suppressor gene involved in mouse thymic lymphomagenesis is located on the distal part of chromosome 4. *Oncogene* **17**:925-929.

Santos J, Montagutelli X, Acevedo A, Lopez P, Vaquero C, Fernandez M, Arnau MR, Szatanik M, Salido E, Guenet JL, Fernandez-Piqueras J. (2002). A new locus for resistance to gamma-radiation-induced thymic lymphoma identified using inter-specific consomic and inter-specific recombinant congenic strains of mice. *Oncogene* **21**:6680-6683.

Santos J, Perez de Castro I, Herranz M, Pellicer A, Fernandez-Piqueras J. (1996). Allelic losses on chromosome 4 suggest the existence of a candidate tumor suppressor gene region of about 0.6 cM in gamma- radiation-induced mouse primary thymic lymphomas. *Oncogene* **12**:669-676.

Saran KK, Gould D, Godec CJ, Verma RS. (1996). Genetics of bladder cancer. *Journal Molecular Medicine* **74**:441-445.

Schwab M, Praml C, Amler LC. (1996). Genomic instability in 1p and human malignancies. *Genes, Chromosomes and Cancer* **16**:211-229.

Shao C, Deng L, Henegariu O, Liang L, Raikwar N, Sahota A, Stambrook PJ, Tischfield JA. (1999). Mitotic recombination produces the majority of recessive fibroblast variants in heterozygous mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**:9230-9235.

Sherr CJ. (2004). Principles of tumor suppression. *Cell* **116**:235-246.

Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, Langford LA, Baumgard ML, Hattier T, Davis T, Frye C, Hu R, Swedlund B, Teng DH, Tavtigian SV. (1997). Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nature Genetics* **15**:356-362.

Thiessen B, Maguire JA, McNeil K, Huntsman D, Martin MA, Horsman D. (2003). Loss of heterozygosity for loci on chromosome arms 1p and 10q in oligodendroglial tumors: relationship to outcome and chemosensitivity. *Journal of Neurooncology* **64**:271-278.

Tischfield JA. (1997). Loss of heterozygosity or: how I learned to stop worrying and love mitotic recombination. *American Journal of Human Genetics* **61**:995-999.

Tischfield JA, Shao C. (2003). Somatic recombination redux. *Nature Genetics* **33**:5-6.

Tsukamoto K, Ito N, Yoshimoto M, Kasumi F, Akiyama F, Sakamoto G, Nakamura Y, Emi M. (1998). Allelic loss on chromosome 1p is associated with progression and lymph node metastasis of primary breast carcinoma. *Cancer* **82**:317-322.

Turker MS, Gage BM, Rose JA, Elroy D, Ponomareva ON, Stambrook PJ, Tischfield JA. (1999). A novel signature mutation for oxidative damage resembles a mutational pattern found commonly in human cancers. *Cancer Research* **59**:1837-1839.

van de Vijver MJ. (1993). Molecular genetic changes in human breast cancer. *Advance in Cancer Research* **61**:25-56.

Waber P, Dlugosz S, Cheng QC, Truelson J, Nisen PD. (1997). Genetic alterations of chromosome band 9p21-22 in head and neck cancer are not restricted to p16INK4a. *Oncogene* **15**:1699-1704.

Walker GJ, Indsto JO, Sood R, Faruque MU, Hu P, Pollock PM, Duray P, Holland EA, Brown K, Kefford RF, Trent JM, Mann GJ, Hayward NK. (2004). Deletion mapping suggests that the 1p22 melanoma susceptibility gene is a tumor suppressor localized to a 9-Mb interval. *Genes, Chromosomes and Cancer* **41**:56-64.

Wang ZC, Lin M, Wei LJ, Li C, Miron A, Lodeiro G, Harris L, Ramaswamy S, Tanenbaum DM, Meyerson M, Iglehart JD, Richardson A. (2004). Loss of heterozygosity and its correlation with expression profiles in subclasses of invasive breast cancers. *Cancer Research* **64**:64-71.

Wijnhoven SW, Van Sloun PP, Kool HJ, Weeda G, Slater R, Lohman PH, van Zeeland AA, Vrieling H. (1998). Carcinogen-induced loss of heterozygosity at the Aprt locus in somatic cells of the mouse. *American Journal of Human Genetics* **95**:13759-13764.

Winton DJ, Blount MA, Ponder BA. (1988). A clonal marker induced by mutation in mouse intestinal epithelium. *Nature* **333**:463-466.

Wistuba II, Behrens C, Virmani AK, Mele G, Milchgrub S, Girard L, Fondon JW, III, Garner HR, McKay B, Latif F, Lerman MI, Lam S, Gazdar AF, Minna JD. (2000). High resolution chromosome 3p allelotyping of human lung cancer and preneoplastic/preinvasive bronchial epithelium reveals multiple, discontinuous sites of 3p allele loss and three regions of frequent breakpoints. *Cancer Research* **60**:1949-1960.

Yeh JJ, Marsh DJ, Zedenius J, Dwight T, Delbridge L, Robinson BG, Eng C. (1999). Fine-structure deletion mapping of 10q22-24 identifies regions of loss of heterozygosity and suggests that sporadic follicular thyroid adenomas and follicular thyroid carcinomas develop along distinct neoplastic pathways. *Genes, Chromosomes and Cancer* **26**:322-328.

Zhu GN, Zuo L, Zhou Q, Zhang SM, Zhu HQ, Gui SY, Wang Y. (2004). Loss of heterozygosity on chromosome 10q22-10q23 and 22q11.2-22q12.1 and p53 gene in primary hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology* **10**:1975-1978.

Zhuang SM, Eklund LK, Cochran C, Rao GN, Wiseman RW, Soderkvist P. (1996). Allelotype analysis of 2',3'-dideoxycytidine- and 1,3-butadiene- induced lymphomas in B6C3F1 mice. *Cancer Research* **56**:3338-3343.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 2.1 LOH analysis.

(a) Representative examples of LOH. Polymorphism was detected with the indicated microsatellite markers on tumor (T) and normal (N) kidney DNA from the same animal. Bands were revealed by non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis and visualized with the Storm PhosphoImager. All LOH shown here were scored > 50%, except in tumors 1AT (D14Mit308) scored as 50%. The 1BT tumor was scored as heterozygote. Arrows indicate the deleted allele. B, BALB/c; C, C57BL/6.

(b) LOH analysis of informative marker/tumor for two discrete and small LOH regions defined by a single informative marker is shown. Percentage of loss for each allele is indicated at the arrows. Intensity of signal is shown for each allele beside them.

Figure 2.2 Deletion mapping of chromosome 4 in MMTV/*ErbB2* Tg mammary tumors.

Microsatellites markers (n=36) covering 12.1 to 82.5 cM were used. ■, tumors with LOH; □, no change in the allelotyping (still heterozygotes for BALB/c and C57BL/6 alleles); ○, noninformative (n.i.) samples (animals carrying homozygous C57BL/6 alleles as described in Cool and Jolicoeur, 1999). The numbers for each of the three types of data (LOH, heterozygote, and n.i.) from all 93 tumors are presented at the bottom of the figure along with the calculated percentage of LOH for each marker. The 26 tumors with contiguous LOH and the 19 tumors without LOH also contain regions with noninformative markers. However, only results showing LOH or heterozygosity were used to calculate the percentage of LOH.

Figure 2.3 Grouping of tumors with LOH in restricted regions of chromosome 4.

(a) LOH regions (Naad4-6 to Naad4-16) with tumors sharing the same LOH locus at each marker.

(b) Each LOH region is represented by a rectangle spanning the deleted area and delimited by heterozygous markers. Black rectangles, >1 tumors at LOH loci; white rectangle, LOH loci with a single tumor. The previously described LOH regions (Naad4-1 to 4-5) are illustrated at the top. In addition, other LOH regions and known tumor suppressor genes described by others and discussed in the text are shown.

Figure 2.4 Deletion mapping of chromosome 19 in MMTV/*ErbB2* Tg mammary tumors. Microsatellites markers (n=25) covering from 0.5 to 55 cM were used. Symbols and calculations are the same as those in Figure 2.

Figure 2.5 Grouping of tumors with LOH in restricted regions of chromosome 19.

(a) LOH regions (Naad19-3 to Naad19-10) with tumors sharing the same LOH locus at each marker.

(b) Each LOH region is represented by a rectangle spanning the deleted area and delimited by heterozygous markers. Black rectangles, >1 tumor at LOH loci; white rectangles, LOH loci with a single tumor. The previously described LOH regions (Naad19-1 and 19-2) are illustrated at the top with also the LOH regions mentioned in the discussion. In addition, other LOH regions and candidate as well as genuine tumor suppressor genes described by others and discussed in the text are shown.

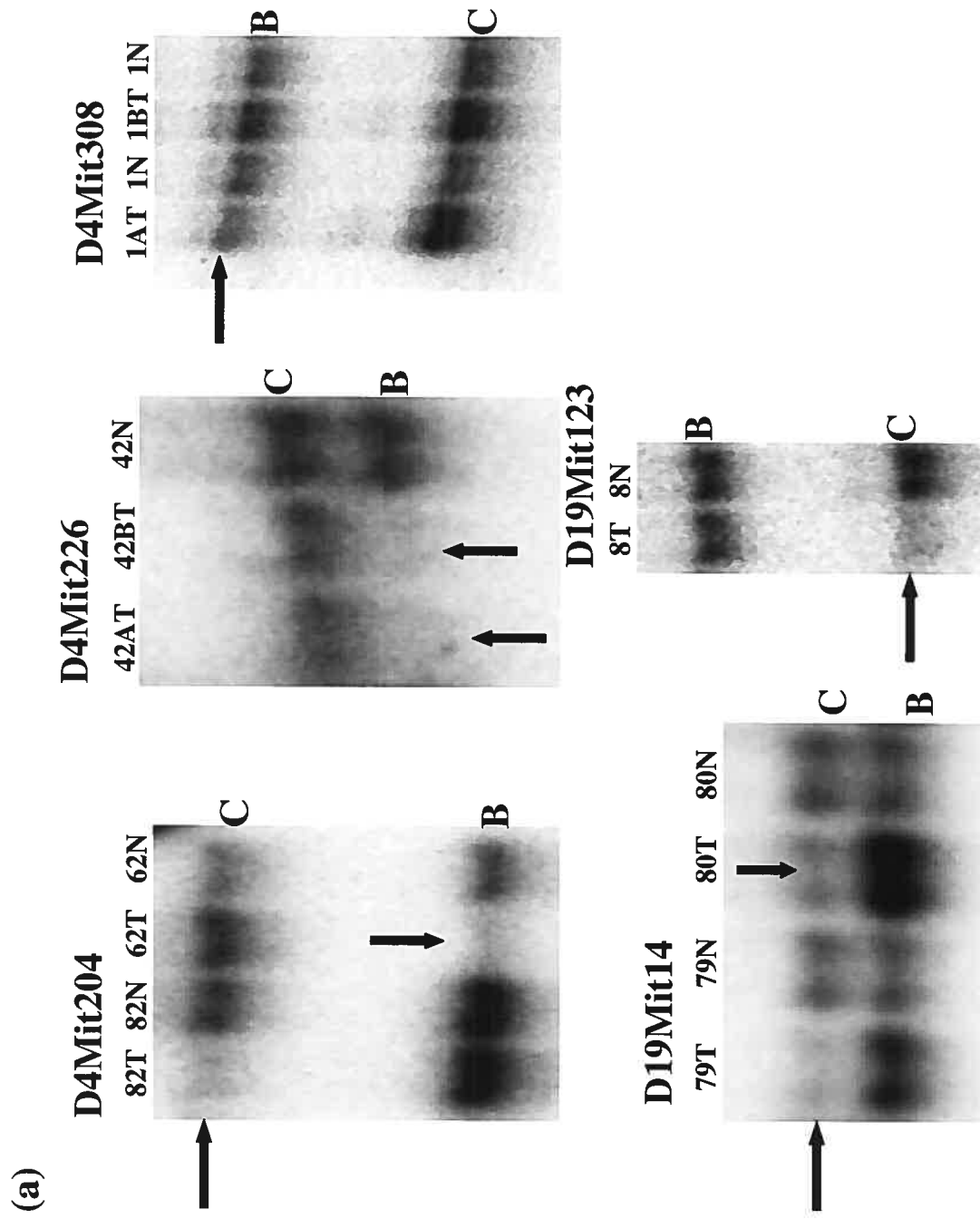


Figure 2.1 LOH analysis. (a) Representative examples of LOH.

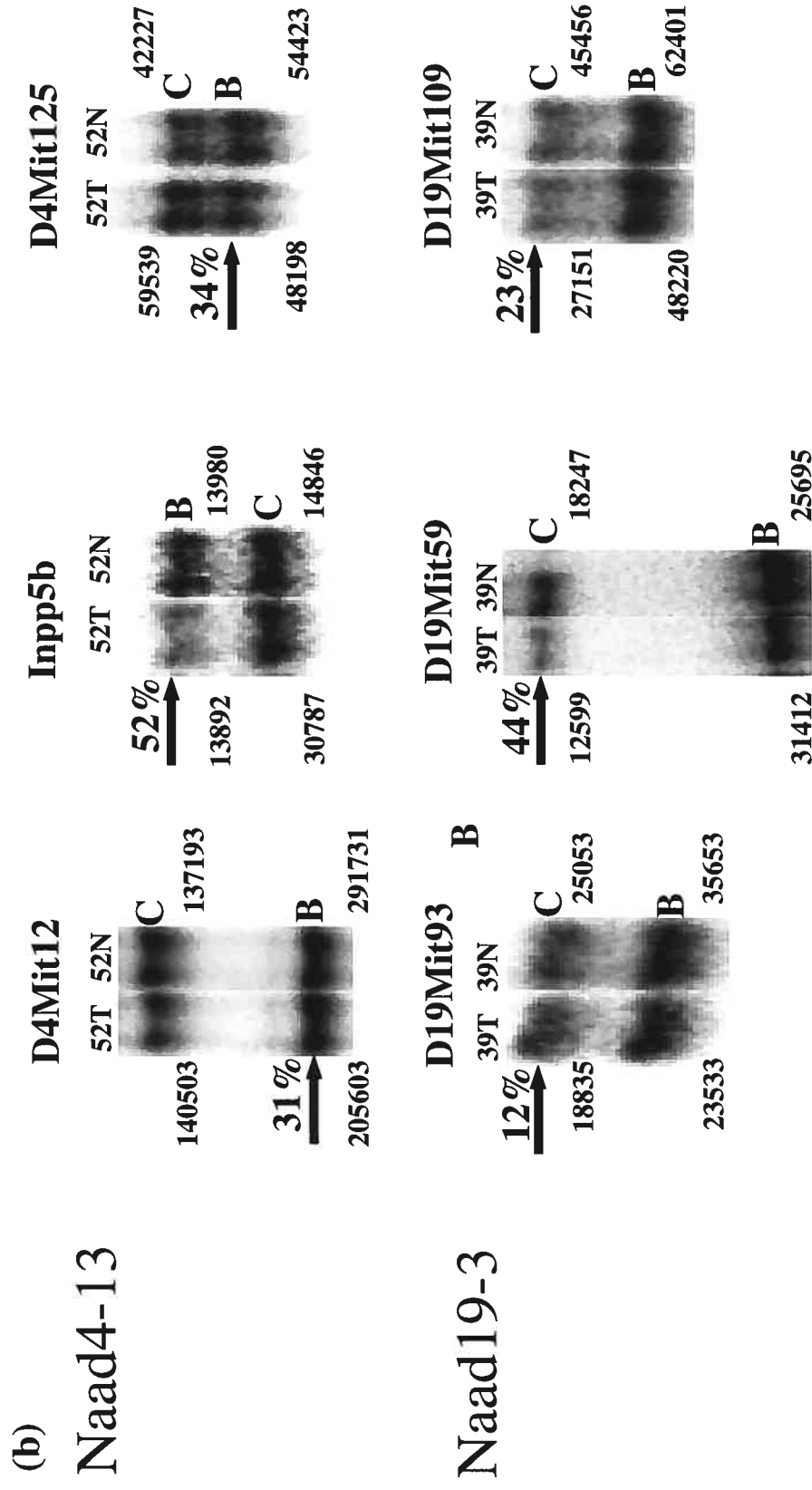


Figure 2.1 LOH analysis. (b) LOH analysis of informative marker/tumor for two discrete and small LOH regions defined by a single informative marker.

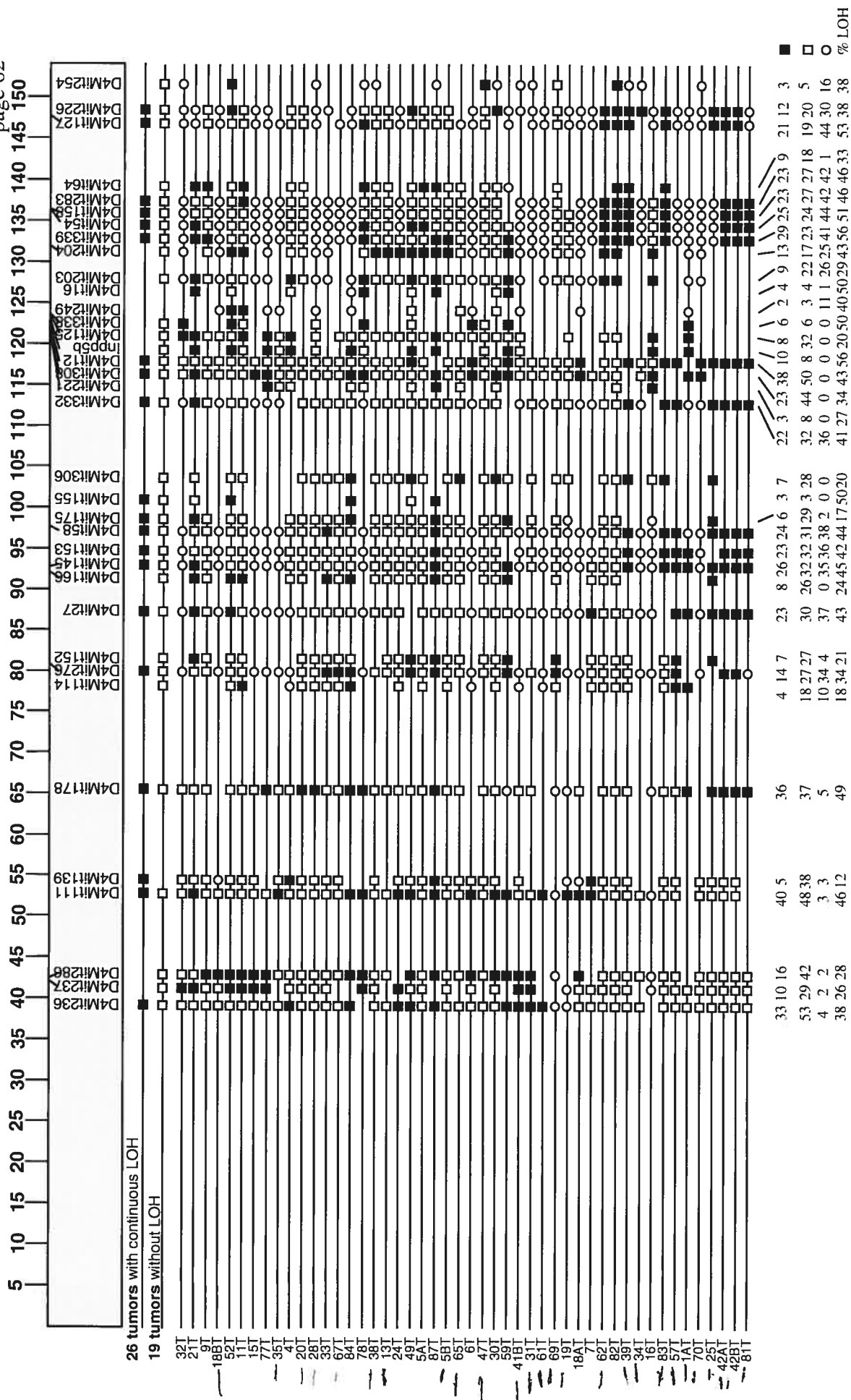


Figure2.2 Deletion mapping of chromosome 4 in MMTV/Erbb2 Tg mammary tumors.

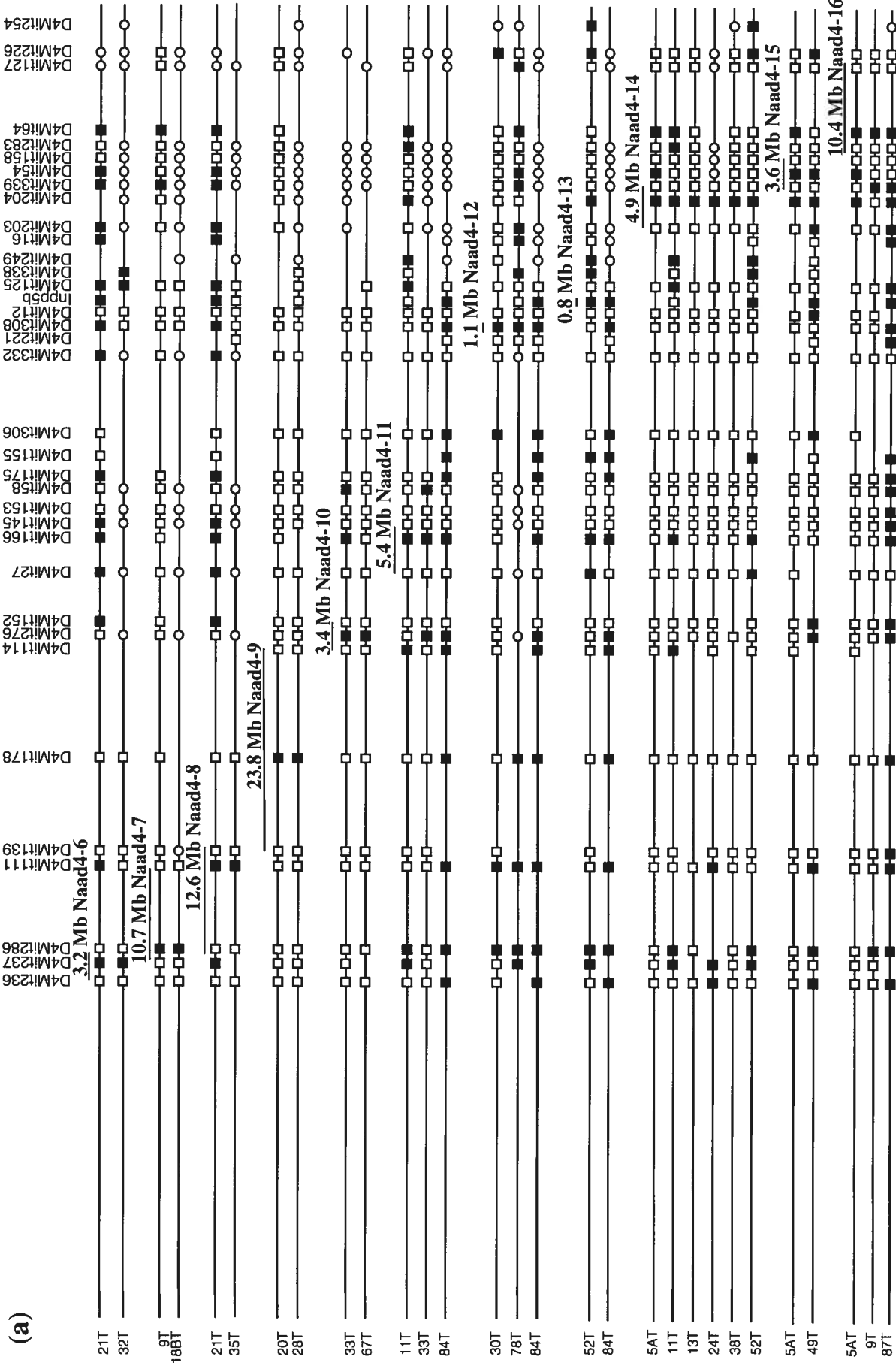
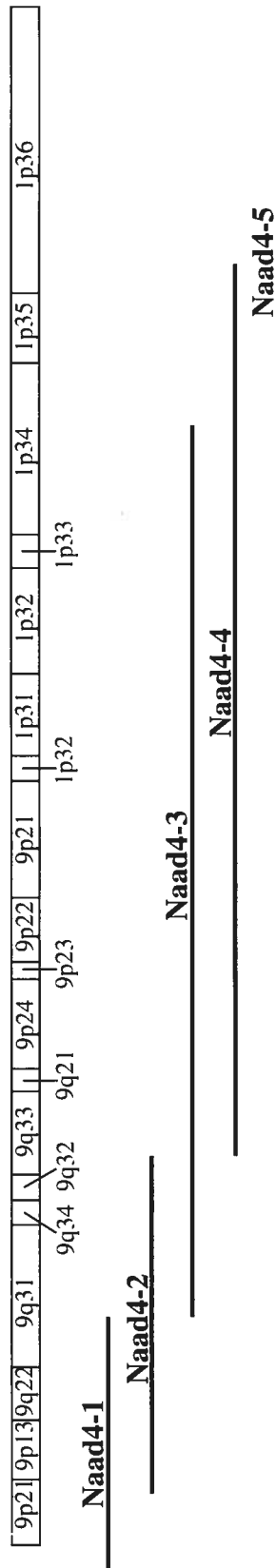


Figure 2.3 Grouping of tumors with LOH in restricted regions of chromosome 4.
(a) LOH regions with tumors sharing the same LOH locus at each marker.

(b)

Human regions of homology with mouse chromosome 4



Mouse chromosome 4

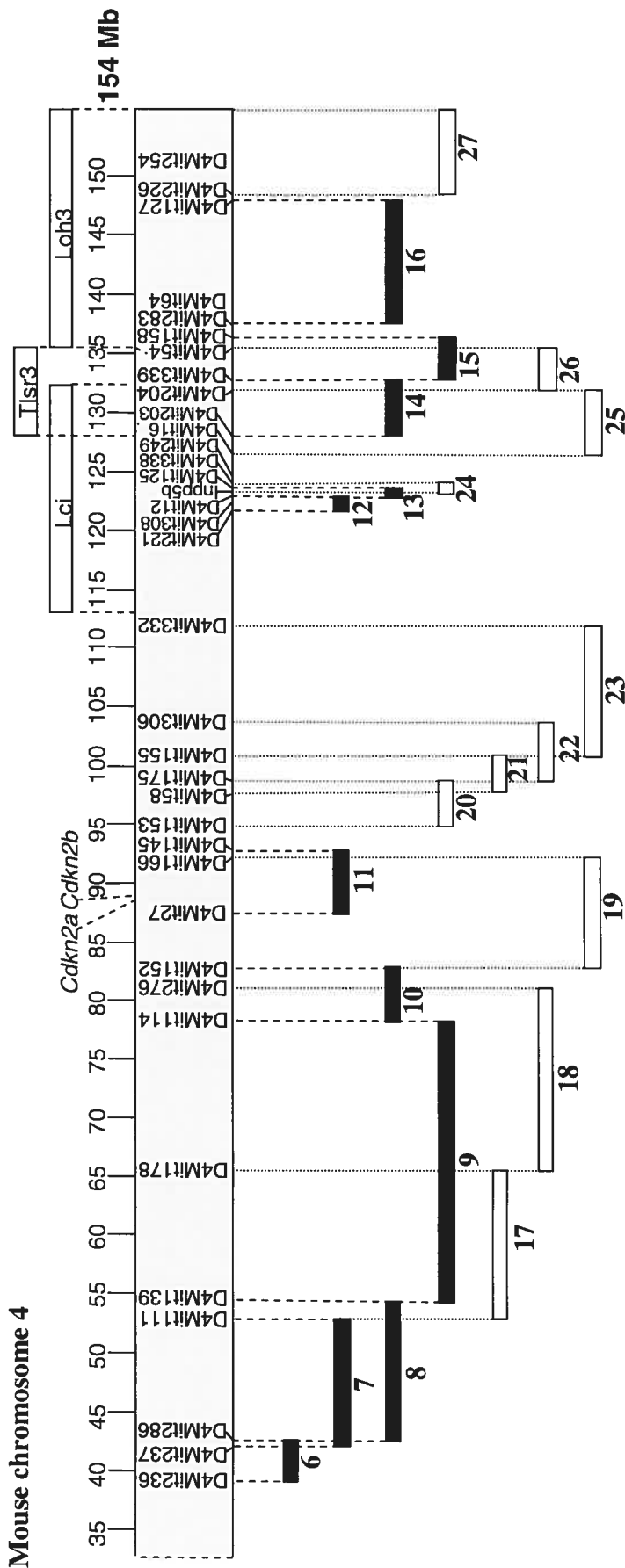


Figure 2.3 Grouping of tumors with LOH in restricted regions of chromosome 4.

(b) LOH region is represented by a rectangle spanning the deleted area and delimited by heterozygous markers. Black rectangles, >1 tumors at LOH loci; white rectangle, LOH loci with a single tumor.

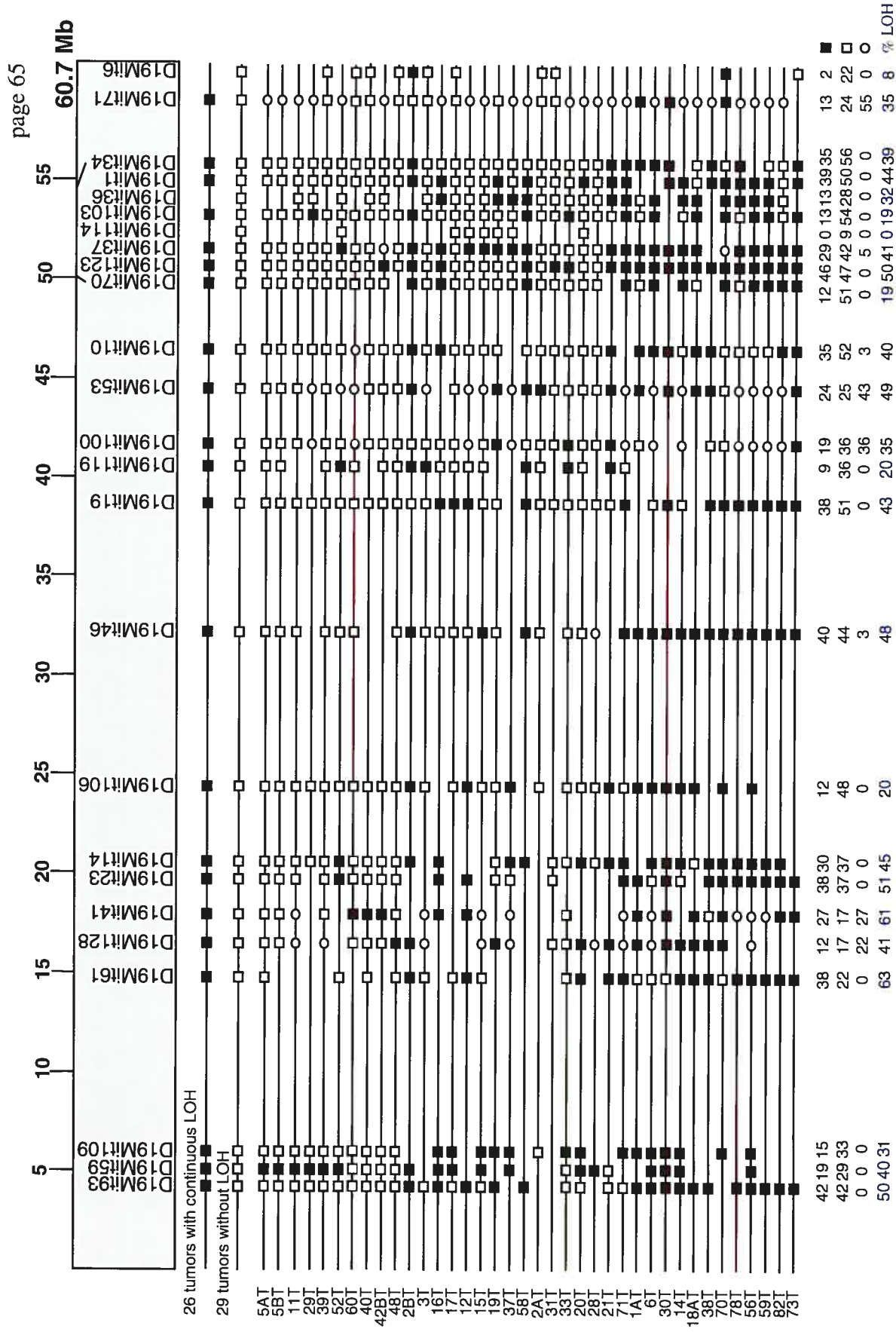


Figure 2.4 Deletion mapping of chromosome 19 in MMTV/*neu* tumors.

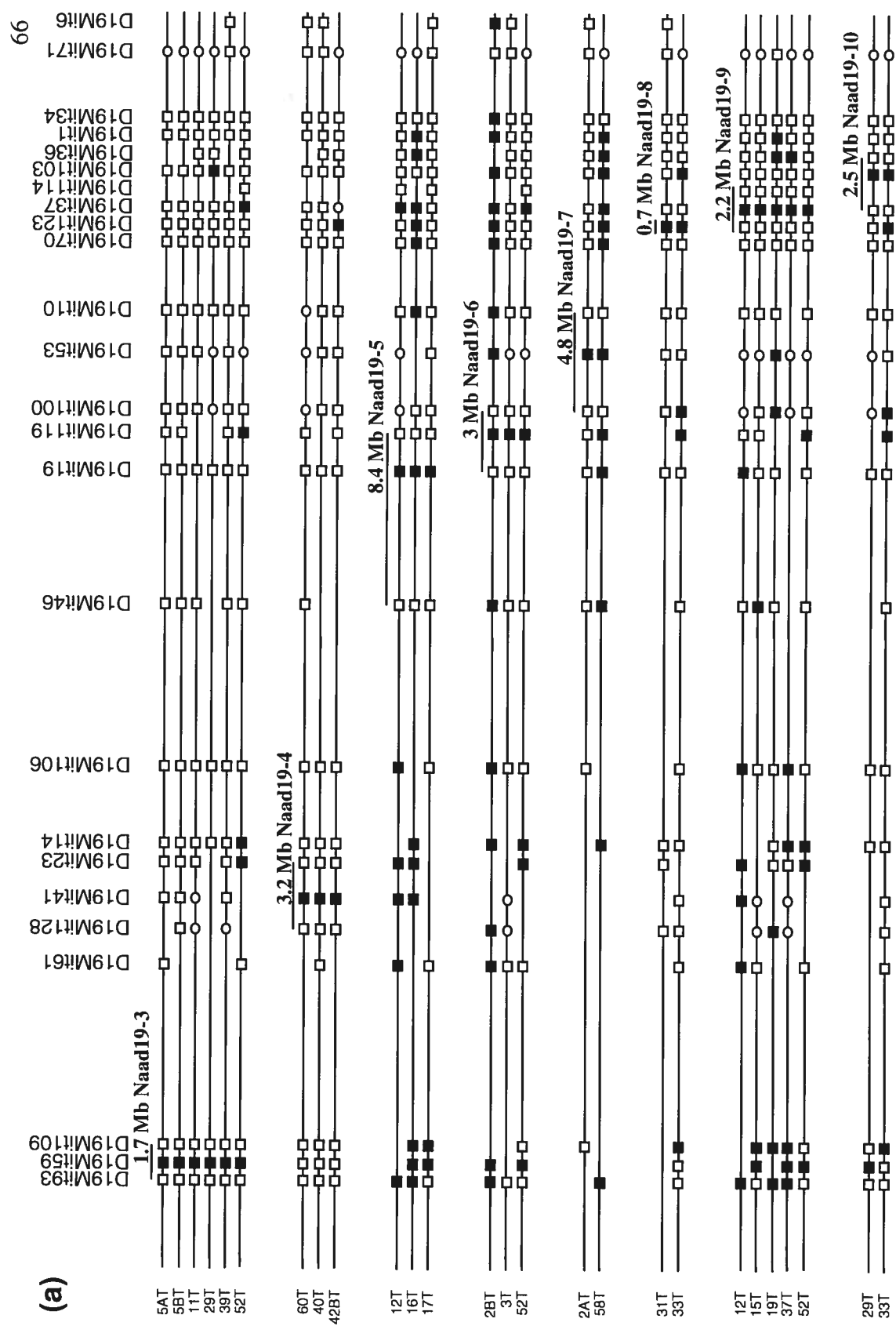


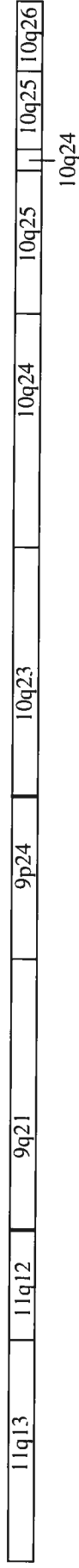
Figure 2.5 Grouping of tumors with LOH in restricted regions of chromosome 19.

(a) LOH regions with tumors sharing the same LOH locus at each marker.

(b)

67

Human homology



Naad19-1

Mouse chromosome 19

Naad19-2

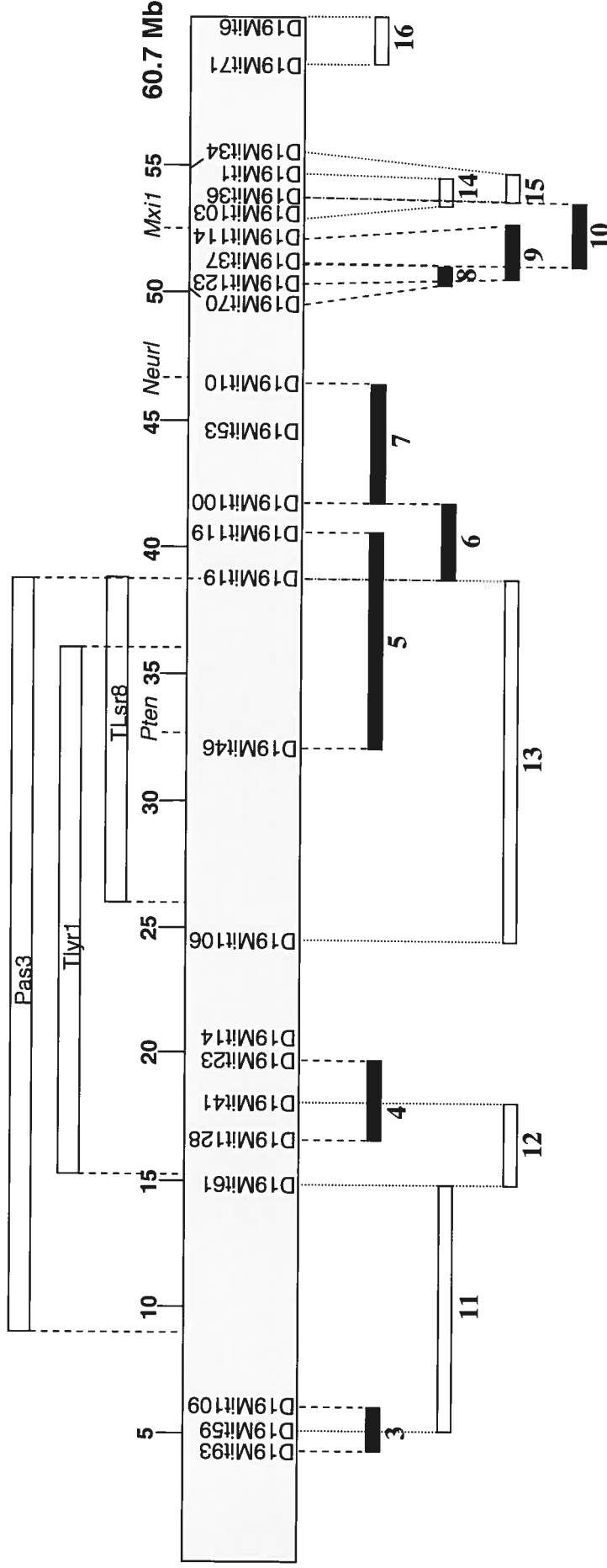


Figure 2.5 Grouping of tumors with LOH in restricted regions of chromosome 19.
(b) Each LOH region is represented by a rectangle spanning the deleted area and delimited by heterozygous markers. Black rectangles, >1 tumor at LOH loci; white rectangles, LOH loci with a single tumor.

CHAPITRE 3

ARTICLE 2

*EphA10 is a candidate tumor supressor gene identified by LOH
in murine erbB2-induced mammary tumors
and mutated within intronic microsatellite repeats*

François Depault, Marc Cool, Zaher Hanna,
Isabelle Labrosse et Paul Jolicoeur¹¹ 2006

Nos travaux sont présentés plus en détails dans la discussion (chapître 5) de cette thèse. Les détails techniques concernant la réalisation des figures 3.1 à 3.5 sont présentés dans les annexes 2, 3, 4, 5A et 5 de cette thèse.

¹¹ Dans la présente thèse, les références (Depault, Cool, Hanna, Labrosse et Jolicoeur, en préparation) et (Depault *et al.*, en préparation) correspondent à l'article décrit sur cette page.

Avant-propos

Le but premier de cette thèse est d'identifier avec la méthode LOH, un nouveau GST impliqué dans le cancer du sein. Malgré les nombreuses études LOH réalisées sur les tumeurs du sein, les loci détectés demeurent larges et le nombre de GST identifié limité. Sur le chromosome 4 des tumeurs mammaires des souris Tg MMTV/*neu*, nous avons identifié deux nouveaux loci LOH chevauchants, Naad4-13a (283 kb) et Naad4-13b (124kb), qui subdivisent le locus Naad4-13 (~800 Kb) identifié précédemment par Cool, Depault et Jolicoeur (2006). Les loci Naad4-13a/Naad4-13b contiennent un nouveau gène suppresseur de tumeurs candidat : EphA10. Ce gène est muté dans deux tumeurs mammaires MMTV/*neu* du locus Naad4-13b. Ces mutations surviennent dans l'intron 8 suite à la recombinaison homologue de la séquence microsatellite D4Mit279. Cette mutation pourrait modifier l'expression du gène EphA10 dans les tumeurs mammaires MMTV/*neu*. Cet article contient la majorité des travaux effectués durant mes études doctorales de troisième cycle soit :

- L'élaboration d'un contig de BACs (CITB) couvrant la région LOH Naad4-13 (figure 3.1A et annexe 4 de cette thèse).
- L'analyse par Southern blot des séquences entre les marqueurs D4Mit147 et D4Mit279 et ce, sur plusieurs tumeurs MMTV/*neu* pertinentes (figure 3.1B et annexe 3).
- L'analyse LOH détaillée du locus Naad4-13 sur 93 tumeurs MMTV/*neu*, la localisation des loci LOH Naad4-13a et Naad4-13b, ainsi que l'identification d'un nouveau gène suppresseur candidat : EphA10 (figure 3.2 et annexe 5A).
- La recherche de mutations dans les séquences du gène EphA10 et l'identification d'un événement de recombinaison impliquant le marqueur D4Mit279 chez deux tumeurs MMTV/*neu* indépendantes (figure 3.3 et annexe 5A).
- L'étude de l'expression du gène EphA10 par Northern blot (figure 3.5 et annexe 5A) et RT-PCR (figure 3.4 et annexe 5A) incluant l'identification de la forme tronquée (intron 11) du récepteur EphA10. Ce travail inclut la construction et la transfection du cosmide CMV/EphA10^{WT} (annexe 5).

L'article Depault *et al.* 2006 identifie un nouveau GST candidat muté à l'intérieur d'une région LOH récurrente du chromosome 4 des tumeurs mammaires MMTV/*neu*. Ma contribution à la production de cet article a été essentielle, majeure et déterminante.

ABSTRACT

Using MMTV/erbB2-neu Tg mice which spontaneously develop mammary carcinoma, we previously reported the presence of 36 LOH sites on chromosome 4 and 19. This fine allelotyping has provided the most refined LOH analysis yet available to date for these tumor chromosomes. These LOH regions have intervals short enough (three with ≤ 1 Mb, and six with 1-3 Mb) to be amenable to molecular genetic analysis. The work described above suggested it should be possible to identify novel tumor-suppressor genes (TSG) mapping within these discrete regions. We have identified a gene (EphA10) which has been mutated in MMTV/*neu* mammary tumors (LOH analysis). Indeed, we identified (sequencing) a mutations within intron 8 sequences (D4Mit279) of the EphA10 gene in two informative MMTV/*neu* tumors (35T and 41BT) showing restricted LOH (Naad4-13a and Naad4-13b) on chromosome 4. The mutation is a very interesting one, as it arose apparently by homologous recombination within microsatellite sequences (D4Mit279). Mutations in introns have the potential to affect either splicing or levels of expression of RNA (truncated form intron 10). The EphA10 gene is a member of one of the most interesting families of receptors involved in many important biological processes, notably axon guidance and angiogenesis. We believe these findings to be especially important because EphA10 maps at the human syntenic region 1p32-34, a very frequent site of LOH in human tumors, particularly breast tumors.

INTRODUCTION

The amplification and overexpression of the *erbB2/neu* gene in human breast cancers is a frequent event contributing to the malignant potential of these tumors ¹. Similarly, overexpression of wild-type or activated *erbB2/neu* in mammary cells of transgenic (Tg) mice has been found to lead to the development of mammary tumors ²⁻⁴. In these mouse models, mammary tumors arise stochastically and after long latency, suggesting that the *erbB2/neu* oncogene is not by itself sufficient to induce tumor formation, but rather requires additional genetic events. Such genetic events could be the activation of other oncogenes or the inactivation of tumor-suppressor genes (TSG). Cooperation between oncogenes and TSG is a well accepted concept in tumor cell biology ⁵. The identification of the TSG cooperating with *erbB2* oncogene would further enhance our understanding of the molecular pathogenesis of these tumors and could provide additional targets for diagnosis and therapy.

TSGs are defined as recessive genes whose complete inactivation on both alleles favors tumor formation and/or expansion ⁶. Therefore, they often reside in chromosomal regions which are the site of frequent loss of heterozygosity (LOH) in tumors. In hereditary cancers, the loss of one allele represents, according to Knudson's 2-hit model, the second-hit, while the first-hit involves the genetically transmitted mutation on the other allele by either small mutations or less frequently by larger deletions ⁷. However, LOH does not always reflect a physical loss of genomic sequences. It has indeed been shown in recent years that LOH very often occurs by mitotic recombination, especially when LOH is detected at multiple non-contiguous loci along the same chromosome ⁸. In most instances, the recombination breakpoints have remained unidentified.

Whatever the molecular mechanisms giving rise to LOH, the identification of LOH regions represents a powerful tool to identify TSG. Toward this goal, we have previously characterized the LOH regions of mammary tumors arising in Tg mice expressing the *erbB2/neu* oncogene constitutively in their mammary cells ⁹. Some of these LOH sites mapped in a region of mouse chromosome 4 syntenic to human chromosome 1p32-34, a region of frequent LOH in human tumors ¹⁰, including in breast cancers ¹¹⁻¹⁵. In order to identify a candidate TSG (*EphA10*) involved in the development of these *erbB2*-induced mammary tumors, we focused our study on one of these LOH regions of chromosome 4, Naad4-13, whose interval was relatively small ⁹.

MATERIALS AND METHODS

Tumors and DNA samples

The origin of the mammary tumors were from the (BALB/c X C57BL/6)F₁ MMTV/neu Tg female mice, described previously ⁷⁰. DNA was extracted from the mammary tumors and from the kidney of the same animal, as described previously ⁷⁰.

PCR-based microsatellite marker analysis and LOH detection

A PCR-based assay with primers flanking microsatellites repeats ^{71,72} was used to detect LOH, essentially as described previously ⁷⁰. The list of these markers is shown in Fig. 3.1. The position of these markers on the mouse genome was confirmed on the UCSC database (2006) as well as on a BAC clone. Primer oligonucleotides were obtained from Research Genetics (Huntsville, AL). Analysis of LOH was performed as previously described ⁷⁰. Loading buffer (2X) (0.08% bromophenol blue, 0.08% xylene cyanol, and 10% glycerol) was added to the amplified PCR mix reaction. Samples (5 µl) were loaded on a 6% non-denaturing PAGE and run in 1 X TBE buffer (Tris 0.09 M, boric acid 0.09 M, EDTA 2 mM). Each sample was compared with that of normal DNA (kidney) extracted from the same animal. The assessment of allelic loss (LOH) was scored visually with the Storm Phospho-imager (Molecular Dynamics). Only tumors showing 50% or more decrease in intensity of one of the allelic fragments were scored as positive for LOH. More than 2 assays were done to confirm LOH, and heterozygosity.

PCR amplification of DNA fragments

PCR fragments were amplified and cloned in Bluescript vector essentially as described previously ⁷⁰. Primers used to clone the 1.2 kbp intron 8 fragment were: primer #1818 (5' CGGCTGAGCTTTTCTTTCTG) and primer #1821 (5' AGGCTCTTCTCCAGGGTGAC). Primers used to amplify genomic probes (Fig. 3.1C) were: for probe1, primer #1740 (5' GAAGCAGTTCTCCTGGCAAC) and #1741 (5' GTAAAGCCCTTTCTCGACCC), for probe2, primer #1631 (5' CCCCAATTTTCAGGGTAGTCC), and #1632 (5' GCATCCAGAATCTTCCAAGC), for probe3, primer #1808 (5' TTCCTCTCTAGTTGCCCA) and #1809 (5' GGGAGAATCCTAATCGCACA), and for probe4, primer #1820 (5' CGGCTGAGCTTTTCTTTCTG) and primer #1821 (5' AGGCTCTTCTCCAGGGTGAC).

RT-PCR amplification

Total RNA (5 µg) extracted from the tissues or cell lines were transcribed with Moloney MuLV reverse transcriptase, as described previously^{73,74}.

BAC contig

The 129/J BAC library was obtained from Research Genetics. Sib-selection of sub-libraries by PCR using primers detecting the sequences at the end of each BAC clone was performed.

DNA and Southern blot analysis

DNA extraction, digestion with restriction endonucleases, separation of DNA fragments by agarose gel electrophoresis, and hybridization with ³²P-labeled probes by the method of Southern were performed as described previously⁷⁴.

RT-PCR and Northern blot analysis

RT-PCR was carried out with the indicated primers (annexe 2 thèse Depault 2006) on RNA extracted from 293T cells transduced with the full-length EphA10 gene under the regulation of the CMV promoter.

Cells were transfected with cosmide, RNA (10 µg total RNA) was separated on an 1.2% agarose gel, blotted on nitrocellulose and hybridized with a cDNA probe. The gel was stained with ethidium bromide before blotting to allow estimation of the RNA amounts loaded (not shown).

Sequence analysis

Sequence of DNA fragments was done on the Beckman or Applied Biosystems instruments. Homology searches using BLAST were carried out on the NCBI and EBI Web sites by using the human and mouse genome databases. Searches for known domains were done by using the conserved domain database at NCBI with the latest versions of SMART v.3.3 Pfam v6.6, PSPOR II, and ScanProsite programs.

RESULTS

Fine mapping of the chr4 Naad4-13 LOH site in erbB2/neu-induced mammary tumors within intervals of 124 and 283 kbp

The previously identified Naad4-13 LOH region was mapped between D4Mit12 and D4Mit125 and spans a ~800 kb interval ⁹. Additional microsatellite markers showing polymorphism at the BALB/c and C57BL/6 alleles were available for these genomic sequences. To confirm their mapping within this region and their relative position, a partial BAC contig was constructed (Fig. 3.1A) and the informative markers assayed on different 129/J BAC DNAs (data not shown). Results from this analysis confirmed the order: 5'-D4Mit12, Inpp5b, D4Mit147, D4Mit279, D4Mit125-3'. Moreover, this analysis revealed that D4Mit147 and D4Mit279 were very close (~14 kb), both reacting with a single BAC clone (CITB159N1), within a single gene (EphA10; NCBI-2006) (Fig. 3.1B).

We used these additional microsatellite markers to narrow down the Naad4-13 LOH region in tumors showing a restricted LOH of this region. This analysis revealed that three tumors (41BT, 35T and 6T) showed a very restricted LOH region detected only with D4Mit279, but not with D4Mit147 nor with D4Mit125, narrowing down this LOH region (Naad4-13b) to a ~283 kb interval (Fig. 3.2). Also, two additional tumors (28T and 11T) showed LOH with the D4Mit147 marker but not with Inpp5b nor with D4Mit279, further narrowing down this region (Naad4-13a) to a ~124 kb interval. In addition, a few other tumors (52T, 84T, 49T and 78T) have sustained a restricted LOH in the same region, while other tumors (16T, 87T, 1AT, 77T and 21T) share the same 5' LOH border at D4Mit12 (Fig. 3.2).

Since LOH often represents allelic deletion of sequences of this region, and since the short distance (~14 kbp) between D4Mit147 and D4Mit279 made a study by restriction analysis feasible, we digested DNA from tumors 4T, 6T, 11T, 21T, 28T, 35T, 41T, 52T, 59T and 68T with SacI and BamHI restriction endonucleases and hybridized them with probes 1 to 4 mapping within this region of LOH (Fig. 3.1C). This analysis revealed only the presence of the germ-line fragment. However, expected novel fragments originating from putative deleted rearranged fragments were absent (data not shown), suggesting that the detected LOH may not have resulted from a simple deletion of DNA sequences from

one allele. Further work indeed showed that a homologous recombination had occurred in this region (see below), probably explaining the absence of a rearranged fragment in these tumors.

The LOH at the Naad4-13a locus appears to have occurred by recombination within the microsatellite sequences.

Since deletion of sequences may not explain the generation of the Naad4-13a/13b LOH in these tumors, we looked for alternative genetic alterations. A 1.2 kb fragment surrounding the D4Mit279 microsatellite marker was amplified from 3 tumors (6T, 35T and 41BT) and from corresponding normal tissue DNA (extracted from the kidney of the same animal). Sequencing of these genomic sequences showed that only DNA from tumors 35T and 41BT harbor an homologous recombination within the microsatellite repeats, involving both the CA (D4Mit279) and the poly T repeats. This event generated two new alleles each with a new repeat (mutant 1 repeat: CA12/T32 and mutant 2 repeat: CA19/T52) of a length distinct from that of the parental BALB/c (CA19/T32) or C57BL/6 (CA12/T52) DNA (Fig. 3.3 A,B). Such structure strongly suggests that the recombination event occurred between the CA and the poly T repeated sequences. By DraI restriction enzyme analysis of the amplified 1.2 kbp DNA clones, containing both the CA repeats and the poly T tract, the two novel mutated alleles could be easily visualized (Fig. 3.3B).

The recombination observed at the Naad4-13 locus occurs within intron 8 of the EphA10 gene

Comparison of the DNA sequences of the 1.2 kb fragment around the repeated sequences detected by the D4Mit279 marker with the available mouse genomic sequences showed that these repeated sequences fall within intron 8 of the EphA10 gene, a member of the large ephrin receptor gene family (Fig. 3.1B). The intronic CA/poly T repeated sequences are 229 bp in upstream of exon 9 which codes for the intracellular domain proximal to the membrane region. The newly generated repeat sequences within intron 8 may affect the expression of EphA10 truncated form (intron 10).

Alternative splicing of the EphA10 gene

Since the length of the CA or poly T repeats may affect proper splicing, we first studied the splicing of the normal EphA10 gene. In the EST mouse or human databases, no full-length EphA10 EST was available, although, one mouse EST extends from exon 6 to the last exon 17 (Fig. 3.4A), suggesting that it may come from full-length transcripts. Interestingly, a few mouse and human ESTs stop at exon 10 and extended into intron 10, thus having the capacity to code for a truncated molecule, encoding mainly the ectodomain. A similar truncated cDNA structure has been found in another member of this gene family, EphA7, which is most closely related to EphA10.

To determine whether additional spliced variants could be identified, RT-PCR analysis was carried out with various primers on RNA extracted from normal mouse tissues or from 293T cells transduced with the wild-type full-length gene (34 kbp) harboring all the coding exons of EphA10 expressed under the regulation of the CMV promoter (CMV/EphA10^{WT}). This analysis revealed some cDNA structures similar to those of the published EST (Fig. 3.4A). The abundance of intronic 10 ESTs led us to amplify transcripts possibly harboring these intronic sequences, using the intronic 10 primer #2188 and a 5' primer in the CMV promoter (#2230) or in exon 8 (#2191). Among the cDNAs obtained, two cDNAs showed the acquisition of novel exons (8a, 8a+8b) with the conservation of the open reading frame (ORF) in one of them. Also, three other transcripts, harboring either only exon 1, exon 10 and intron 10, or with an additional sequence (exon 7 for one and exon 4 and part of intron 4 for the other one) were generated, two of which with an intact ORF. Most of these transcripts would have the capacity to code for only part of the gene, in fact for portions of the ectodomain, including its TM domain.

Northern blot analysis of EphA10 expression. RNA was collected from different tissues and from 293T cell transfect with cosmid CMV/EphA10^{WT}. We postulate that two bands correspond to complete (4.0 kb) and truncated form (2.2 kb) of the EphA10 gene.

DISCUSSION

In the present work, we further narrowed down the Naad4-13 LOH locus (809 kb) previously described ⁹ to small interval mapping (124 and 283 kb) on a region of mouse chromosome 4. Our investigation was facilitated by the availability of MMTV/*neu* tumors (28T, 11T, 41BT, 35T, 6T) exhibiting LOH with small intervals. It has indeed been recognized by us ⁹ and others ^{13,16-22} that larger regions of frequent LOH are quite heterogeneous and sometimes contain several independent, discontinuous, smaller LOH regions. We used this information to identify a candidate gene within these two LOH regions (Naad4-13a/Naad4-13b) which was mutated in *erbB2/neu*-induced mammary tumors. Tumor-specific mutations within intron 8 microsatellite sequences (D4Mit279) of the *EphA10* gene were documented in two MMTV/*neu* tumors (35T and 41BT) showing restricted LOH at the Naad4-13b locus. The mutations identified occurred most likely by homologous recombination within a CA/polyT microsatellite repeat. We could identify the breakpoint of recombination within an 84 bp interval, between the CA repeats (D4Mit279) and the polyT repeats. As a consequence of this recombination event, two novel repeated sequences were generated, each of a length distinct from that of the parental BALB/c or C57BL/6 DNA. Therefore, the LOH in tumors 35T and 41BT appears to result from homologous recombination involving the same microsatellite sequences (D4Mit279) used to score allelic strain differences at this locus. The generation of LOH by mitotic recombination is a frequent event ^{8,23} and has been described both in normal ²⁴⁻²⁷ and in tumor ²⁸⁻³² [reviewed in ³³] cells. At this time, the expression of the *EphA10* gene was not investigated in tumors 35T and 41BT because the reagents (tumors) were not available.

The gene targeted by the mutational event of homologous recombination, EphA10, is a member of the large ephrin receptor gene family which has not yet been studied. The genes of this family encode transmembrane receptors with an intracellular tyrosine kinase domain and an ectodomain endowed with the capacity to bind their ligands, the ephrin gene products³⁴⁻³⁸. Member of the Eph receptor/Ephrin ligands have also been implicated in cell transformation and/or cancer [reviewed in^{34,37}]. A few members have been found to be overexpressed in tumor cells: EphrinA1³⁹, EphrinA3⁴⁰, EphrinA2 and B3⁴¹, EphB6^{42,43}, EphB2⁴⁰, EphA2^{41,44-50,50,51}, EphA1⁵², EphA3⁵³, EphB4^{37,50}. In addition, overexpression of EphA2 was correlated with increased invasiveness⁵⁴ and EphB4 expression correlated with degrees of tumor formation^{50,55}, including in ductal breast carcinoma⁵⁶. Transduction of EphA1, EphA2 or EphB2 respectively into NIH/3T3⁶⁰ mammary epithelial⁶¹ or U251 cells⁶² induces their transformation and favors invasiveness. Moreover, EphB4 transgenic expression was shown to cooperate with the *erbB2* oncogene for the development of mammary tumors in *erbB2* Tg mice⁵⁷. On the other hand, there are also reports on the decreased expression of Eph receptors/Ephrin ligand in various cancer cells: EphrinA1, B1⁴¹, EphB6⁵⁸, EphA8⁴⁰, EphA1⁴⁰ and EphB4⁵⁹.

The differential splicing with production of transcripts coding mainly for the ectodomain appears to be a normal process and observed in normal tissues for EphA10 (intron 10, Fig. 3.4 and 3.5) and for other members of this gene family⁶⁴⁻⁶⁸. This mechanism may be inappropriately used by the mutated (intron 8) EphA10 gene in MMTV/*neu* tumors 35T and 41BT. For example, truncated version of EphA10 could be generated by this mutational event. Expression of EphA7 ectodomain has been shown to repress tyrosine phosphorylation of the full-length EphA7 protein⁶⁵ (a similar effect is postulated for EphA10), it therefore possible that the mutated EphA10 gene can lead to a loss-of-function, consistent with the idea that EphA10 is a genuine TSG. Expression of EphB4 ectodomain in mammary epithelial cells was found to favor tumor growth, through binding to its ligand (EphrinB2) on endothelial cells⁶³. In addition, since the Eph receptor/Ephrin ligands signal bidirectionally^{38,69}, it is probable that the overproduced EphA10 ectodomain could bind to its ligand on stromal or endothelial cells and affect signaling of its ligand in such a way that tumor growth is favored. Additional work on the

erbB2-induced mammary tumors with LOH spanning this region may reveal additional types of mutations. In addition, future work in human tumors of diverse origins, including those of the breasts; exhibiting LOH in the 1p32-34 chromosomal region, should indicate the frequency at which EphA10 is mutated in human cancers.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants to Paul Jolicoeur from the Canadian Breast Cancer Research Alliance (CBCRA). We thank Benoît Laganière for excellent technical assistance. We are grateful to Rita Gingras and Monique Villani for preparing the manuscript.

REFERENCES

1. **Salomon, D. S., Brandt, R., Ciardiello, F., and Normanno, N.** (1995). Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Critical Review in Oncology-Hematology* **19**: 183-232.
2. **Muller, W. J., Sinn, E., Pattengale, P. K., Wallace, R., and Leder, P.** (1988). Single-step induction of mammary adenocarcinoma in transgenic mice bearing the activated c-neu oncogene. *Cell* **54**: 105-115.
3. **Andrechek, E. R., Hardy, W. R., Siegel, P. M., Rudnicki, M. A., Cardiff, R. D., and Muller, W. J.** (2000). Amplification of the neu/erbB-2 oncogene in a mouse model of mammary tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 3444-3449.
4. **Bouchard, L., Lamarre, L., Tremblay, P. J., and Jolicoeur, P.** (1989). Stochastic appearance of mammary tumors in transgenic mice carrying the MMTV/c-neu oncogene. *Cell* **57**: 931-936.
5. **Fearon, E. R. and Vogelstein, B.** (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**: 759-67.
6. **Sherr, C. J.** (2004). Principles of tumor suppression. *Cell* **116**: 235-246.
7. **Knudson, A. G.** (1993). Antioncogenes and human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 10914-10921.
8. **Tischfield, J. A.** (1997). Loss of heterozygosity or: how I learned to stop worrying and love mitotic recombination. *American Journal of Human Genetics* **61**: 995-999.
9. **Cool, M., Depault, F., and Jolicoeur, P.** (2005). Fine allelotyping of mouse chromosome 4 and 19 regions syntenic to human chromosomes 1p and 10q in erbB2-induced mammary tumors reveals multiple discontinuous candidate regions of tumor suppressor loci. *Genes, Chromosomes and Cancer*.
10. **Schwab, M., Praml, C., and Amler, L. C.** (1996). Genomic instability in 1p and human malignancies. *Genes, Chromosomes and Cancer* **16**: 211-229.
11. **Imyanitov, E. N., Togo, A. V., Suspitsin, E. N., Grigoriev, M. Y., Pozharisski, K. M., Turkevich, E. A., Hanson, K. P., Hayward, N. K., Chenevix-Trench, G., Theillet, C., and Lavin, M. F.** (2000). Evidence for microsatellite instability in bilateral breast carcinomas. *Cancer Letters* **154**: 9-17.
12. **Lerebours, F., Bertheau, P., Bieche, I., Driouch, K., de The, H., Hacene, K., Espie, M., Marty, M., and Lidereau, R.** (2002). Evidence of chromosome regions and gene involvement in inflammatory breast cancer. *International Journal of Cancer* **102**: 618-622.

13. **Wang, Z. C., Lin, M., Wei, L. J., Li, C., Miron, A., Lodeiro, G., Harris, L., Ramaswamy, S., Tanenbaum, D. M., Meyerson, M., Iglehart, J. D., and Richardson, A.** (2004). Loss of heterozygosity and its correlation with expression profiles in subclasses of invasive breast cancers. *Cancer Research* **64**: 64-71..
14. **Nagai, H., Negrini, M., Carter, S. L., Gillum, D. R., Rosenberg, A. L., Schwartz, G. F., and Croce, C. M.** (1995). Detection and cloning of a common region of loss of heterozygosity at chromosome 1p in breast cancer. *Cancer Research* **55**: 1752-1757.
15. **Tsukamoto, K., Ito, N., Yoshimoto, M., Kasumi, F., Akiyama, F., Sakamoto, G., Nakamura, Y., and Emi, M.** (1998). Allelic loss on chromosome 1p is associated with progression and lymph node metastasis of primary breast carcinoma. *Cancer* **82**: 317-322.
16. **Wistuba, I. I., Behrens, C., Virmani, A. K., Mele, G., Milchgrub, S., Girard, L., Fondon, J. W., III, Garner, H. R., McKay, B., Latif, F., Lerman, M. I., Lam, S., Gazdar, A. F., and Minna, J. D.** (2000). High resolution chromosome 3p allelotyping of human lung cancer and preneoplastic/preinvasive bronchial epithelium reveals multiple, discontinuous sites of 3p allele loss and three regions of frequent breakpoints. *Cancer Research* **60**: 1949-1960.
17. **Walker, G. J., Indsto, J. O., Sood, R., Faruque, M. U., Hu, P., Pollock, P. M., Duray, P., Holland, E. A., Brown, K., Kefford, R. F., Trent, J. M., Mann, G. J., and Hayward, N. K.** (2004). Deletion mapping suggests that the 1p22 melanoma susceptibility gene is a tumor suppressor localized to a 9-Mb interval. *Genes, Chromosomes and Cancer* **41**: 56-64.
18. **Waber, P., Dlugosz, S., Cheng, Q. C., Truelson, J., and Nisen, P. D.** (1997). Genetic alterations of chromosome band 9p21-22 in head and neck cancer are not restricted to p16INK4a. *Oncogene* **15**: 1699-1704.
19. **Kim, S. K., Ro, J. Y., Kemp, B. L., Lee, J. S., Kwon, T. J., Fong, K. M., Sekido, Y., Minna, J. D., Hong, W. K., and Mao, L.** (1997). Identification of three distinct tumor suppressor loci on the short arm of chromosome 9 in small cell lung cancer. *Cancer Research* **57**: 400-403.
20. **Jakobovitz, O., Nass, D., DeMarco, L., Barbosa, A. J., Simoni, F. B., Rechavi, G., and Friedman, E.** (1996). Carcinoid tumors frequently display genetic abnormalities involving chromosome 11. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **81**: 3164-3167.
21. **Kerangueven, F., Noguchi, T., Coulier, F., Allione, F., Wargnietz, V., Simony-Lafontaine, J., Longy, M., Jacquemier, J., Sobol, H., Eisinger, F., and Birnbaum, D.** (1997). Genome-wide search for loss of heterozygosity shows extensive genetic diversity of human breast carcinomas. *Cancer Research* **57**: 5469-5474.
22. **Turker, M. S., Gage, B. M., Rose, J. A., Elroy, D., Ponomareva, O. N., Stambrook, P. J., and Tischfield, J. A.** (1999). A novel signature mutation for

oxidative damage resembles a mutational pattern found commonly in human cancers. *Cancer Research* **59**: 1837-1839.

23. **Tischfield, J. A. and Shao, C.** (2003). Somatic recombination redux. *Nature Genetics* **33**: 5-6.
24. **Gupta, P. K., Sahota, A., Boyadjiev, S. A., Bye, S., Shao, C., O'Neill, J. P., Hunter, T. C., Albertini, R. J., Stambrook, P. J., and Tischfield, J.** (1997). A. High frequency in vivo loss of heterozygosity is primarily a consequence of mitotic recombination. *Cancer Research* **57**: 1188-1193.
25. **Shao, C., Deng, L., Henegariu, O., Liang, L., Raikwar, N., Sahota, A., Stambrook, P. J., and Tischfield, J. A.** (1999). Mitotic recombination produces the majority of recessive fibroblast variants in heterozygous mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 9230-9235.
26. **Wijnhoven, S. W., Van Sloun, P. P., Kool, H. J., Weeda, G., Slater, R., Lohman, P. H., van Zeeland, A. A., and Vrieling, H.** (1998). Carcinogen-induced loss of heterozygosity at the *Aprt* locus in somatic cells of the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 13759-13764.
27. **Winton, D. J., Blount, M. A., and Ponder, B. A.** (1988). A clonal marker induced by mutation in mouse intestinal epithelium. *Nature* **333**: 463-466.
28. **Blackburn, A. C., McLary, S. C., Naeem, R., Luszcz, J., Stockton, D. W., Donehower, L. A., Mohammed, M., Mailhes, J. B., Soferr, T., Naber, S. P., Otis, C. N., and Jerry, D. J.** (2004). Loss of heterozygosity occurs via mitotic recombination in *Trp53*^{+/-} mice and associates with mammary tumor susceptibility of the BALB/c strain. *Cancer Research* **64**: 5140-5147.
29. **Rousseau-Merck, M. F., Versteeg, I., Legrand, I., Couturier, J., Mairal, A., Delattre, O., and Aurias, A.** (1999). *hSNF5/INI1* inactivation is mainly associated with homozygous deletions and mitotic recombinations in rhabdoid tumors. *Cancer Research* **59**: 3152-3156.
30. **Hong, D. P., Kubo, K., Tsugawa, N., Mori, N., Umesako, S., Song, C. W., and Okumoto, M.** (2002). Generation of large homozygous chromosomal segments by mitotic recombination during lymphomagenesis in F1 hybrid mice. *Journal Radiation Research (Tokyo)* **43**: 187-194.
31. **Kruzelock, R. P., Murphy, E. C., Strong, L. C., Naylor, S. L., and Hansen, M. F.** (1997). Localization of a novel tumor suppressor locus on human chromosome 3q important in osteosarcoma tumorigenesis. *Cancer Research* **57**: 106-109.
32. **Jordanova, E. S., Riemersma, S. A., Philippo, K., Giphart-Gassler, M., Schuurin, E., and Kluin, P. M.** (2002). Hemizygous deletions in the HLA region account for loss of heterozygosity in the majority of diffuse large B-cell lymphomas of the testis and the central nervous system. *Genes, Chromosomes and Cancer* **35**: 38-48.

33. **Bishop, A. J. and Schiestl, R. H.** (2003). Role of homologous recombination in carcinogenesis. *Experimental and Molecular Pathology* **74**: 94-105.
34. **Nakamoto, M. and Bergemann, A. D.** (2002). Diverse roles for the Eph family of receptor tyrosine kinases in carcinogenesis. *Microscopy Research and Techniques* **59**: 58-67.
35. **Kullander, K. and Klein, R.** (2002). Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nature Review Molecular Cell Biology* **3**: 475-486.
36. **Klein, R.** (2001). Excitatory Eph receptors and adhesive ephrin ligands. *Cell Biology* **13**: 196-203.
37. **Dodelet, V. C. and Pasquale, E. B.** (2000). Eph receptors and ephrin ligands: embryogenesis to tumorigenesis. *Oncogene* **19**: 5614-5619.
38. **Murai, K. K. and Pasquale, E. B.** (2003). 'Eph'ective signaling: forward, reverse and crosstalk. *Journal of Cell Science* **116**: 2823-2832.
39. **Brantley, D. M., Cheng, N., Thompson, E. J., Lin, Q., Brekken, R. A., Thorpe, P. E., Muraoka, R. S., Cerretti, D. P., Pozzi, A., Jackson, D., Lin, C., and Chen, J.** (2002). Soluble Eph A receptors inhibit tumor angiogenesis and progression in vivo. *Oncogene* **21**: 7011-7026.
40. **Hafner, C., Schmitz, G., Meyer, S., Bataille, F., Hau, P., Langmann, T., Dietmaier, W., Landthaler, M., and Vogt, T.** (2004). Differential gene expression of Eph receptors and Ephrins in benign human tissues and cancers. *Clinical Chemistry* **50**: 490-499.
41. **Fox, B. P. and Kandpal, R. P.** (2004). Invasiveness of breast carcinoma cells and transcript profile: Eph receptors and ephrin ligands as molecular markers of potential diagnostic and prognostic application. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **318**: 882-892.
42. **Tang, X. X., Evans, A. E., Zhao, H., Cnaan, A., London, W., Cohn, S. L., Brodeur, G. M., and Ikegaki, N.** (1999). High-level expression of EPHB6, EFNB2, and EFNB3 is associated with low tumor stage and high TrkA expression in human neuroblastomas. *Clinical Cancer Research* **5**: 1491-1496.
43. **Tang, X. X., Zhao, H., Robinson, M. E., Cohen, B., Cnaan, A., London, W., Cohn, S. L., Cheung, N. K., Brodeur, G. M., Evans, A. E., and Ikegaki, N.** (2000). Implications of EPHB6, EFNB2, and EFNB3 expressions in human neuroblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 10936-10941.
44. **Walker-Daniels, J., Coffman, K., Azimi, M., Rhim, J. S., Bostwick, D. G., Snyder, P., Kerns, B. J., Waters, D. J., and Kinch, M. S.** (1999). Overexpression of the EphA2 tyrosine kinase in prostate cancer. *Prostate* **41**: 275-280.

45. **Kataoka, H., Igarashi, H., Kanamori, M., Ihara, M., Wang, J. D., Wang, Y. J., Li, Z. Y., Shimamura, T., Kobayashi, T., Maruyama, K., Nakamura, T., Arai, H., Kajimura, M., Hanai, H., Tanaka, M., and Sugimura, H.** (2004). Correlation of EPHA2 overexpression with high microvessel count in human primary colorectal cancer. *Cancer Science* **95**: 136-141.
46. **Miyazaki, T., Kato, H., Fukuchi, M., Nakajima, M., and Kuwano, H.** (2003). EphA2 overexpression correlates with poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *International Journal of Cancer* **103**: 657-663.
47. **Kinch, M. S., Moore, M. B., and Harpole, D. H., Jr.** (2003). Predictive value of the EphA2 receptor tyrosine kinase in lung cancer recurrence and survival. *Clinical Cancer Research* **9**: 613-618.
48. **Easty, D. J., Herlyn, M., and Bennett, D. C.** (1995). Abnormal protein tyrosine kinase gene expression during melanoma progression and metastasis. *International Journal of Cancer* **60**: 129-136.
49. **Easty, D. J. and Bennett, D. C.** (2000). Protein tyrosine kinases in malignant melanoma. *Melanoma Research* **10**: 401-411.
50. **Andres, A. C., Reid, H. H., Zurcher, G., Blaschke, R. J., Albrecht, D., and Ziemiecki, A.** (1994). Expression of two novel eph-related receptor protein tyrosine kinases in mammary gland development and carcinogenesis. *Oncogene* **9**: 1461-1467.
51. **Lu, M., Miller, K. D., Gokmen-Polar, Y., Jeng, M. H., and Kinch, M. S.** (2003). EphA2 overexpression decreases estrogen dependence and tamoxifen sensitivity. *Cancer Research* **63**: 3425-3429.
52. **Maru, Y., Hirai, H., Yoshida, M. C., and Takaku, F.** (1988). Evolution, expression, and chromosomal location of a novel receptor tyrosine kinase gene, eph. *Molecular & Cellular Biology* **8**: 3770-6.
53. **Ogawa, K., Pasqualini, R., Lindberg, R. A., Kain, R., Freeman, A. L., and Pasquale, E. B.** (2000). The ephrin-A1 ligand and its receptor, EphA2, are expressed during tumor neovascularization. *Oncogene* **19**: 6043-6052.
54. **Duxbury, M. S., Ito, H., Zinner, M. J., Ashley, S. W., and Whang, E. E.** (2004). EphA2: a determinant of malignant cellular behavior and a potential therapeutic target in pancreatic adenocarcinoma. *Oncogene* **23**: 1448-1456.
55. **Nikolova, Z., Djonov, V., Zuercher, G., Andres, A. C., and Ziemiecki, A.** (1998). Cell-type specific and estrogen dependent expression of the receptor tyrosine kinase EphB4 and its ligand ephrin-B2 during mammary gland morphogenesis. *Journal of Cell Science* **111** (Pt 18): 2741-2751.
56. **Berclaz, G., Andres, A. C., Albrecht, D., Dreher, E., Ziemiecki, A., Gusterson, B. A., and Crompton, M. R.** (1996). Expression of the receptor protein tyrosine

kinase myk-1/htk in normal and malignant mammary epithelium. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **226**: 869-875.

57. **Munarini, N., Jager, R., Abderhalden, S., Zuercher, G., Rohrbach, V., Loercher, S., Pfanner-Meyer, B., Andres, A. C., and Ziemiecki, A.** (2002). Altered mammary epithelial development, pattern formation and involution in transgenic mice expressing the EphB4 receptor tyrosine kinase. *Journal of Cell Science* **115**: 25-37.
58. **Hafner, C., Bataille, F., Meyer, S., Becker, B., Roesch, A., Landthaler, M., and Vogt, T.** (2003). Loss of EphB6 expression in metastatic melanoma. *International Journal of Oncology* **23**: 1553-1559.
59. **Berclaz, G., Flutsch, B., Altermatt, H. J., Rohrbach, V., Djonov, V., Ziemiecki, A., Dreher, E., and Andres, A. C.** (2002). Loss of EphB4 receptor tyrosine kinase protein expression during carcinogenesis of the human breast. *Oncology Reports* **9**: 985-989.
60. **Maru, Y., Hirai, H., and Takaku, F.** (1990). Overexpression confers an oncogenic potential upon the eph gene. *Oncogene* **5**: 445-7.
61. **Zelinski, D. P., Zantek, N. D., Stewart, J. C., Irizarry, A. R., and Kinch, M. S.** (2001). EphA2 overexpression causes tumorigenesis of mammary epithelial cells. *Cancer Research* **61**: 2301-2306.
62. **Nakada, M., Niska, J. A., Miyamori, H., McDonough, W. S., Wu, J., Sato, H., and Berens, M. E.** (2004). The phosphorylation of EphB2 receptor regulates migration and invasion of human glioma cells. *Cancer Research* **64**: 3179-3185.
63. **Noren, N. K., Lu, M., Freeman, A. L., Koolpe, M., and Pasquale, E. B.** (2004). Interplay between EphB4 on tumor cells and vascular ephrin-B2 regulates tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 5583-5588.
64. **Ciossek, T., Millauer, B., and Ullrich, A.** (1995). Identification of alternatively spliced mRNAs encoding variants of MDK1, a novel receptor tyrosine kinase expressed in the murine nervous system. *Oncogene* **10**: 97-108.
65. **Holmberg, J., Clarke, D. L., and Frisen, J.** (2000). Regulation of repulsion versus adhesion by different splice forms of an Eph receptor. *Nature* **408**: 203-206.
66. **Sajjadi, F. G., Pasquale, E. B., and Subramani, S.** (1991). Identification of a new eph-related receptor tyrosine kinase gene from mouse and chicken that is developmentally regulated and encodes at least two forms of the receptor. *New in Biology* **3**: 769-778.
67. **Valenzuela, D. M., Rojas, E., Griffiths, J. A., Compton, D. L., Gisser, M., Ip, N. Y., Goldfarb, M., and Yancopoulos, G. D.** (1995). Identification of full-length and truncated forms of Ehk-3, a novel member of the Eph receptor tyrosine kinase family. *Oncogene* **10**: 1573-1580.

68. **Xu, Q., Alldus, G., Holder, N., and Wilkinson, D. G.** (1995). Expression of truncated Sek-1 receptor tyrosine kinase disrupts the segmental restriction of gene expression in the *Xenopus* and zebrafish hindbrain. *Development* **121**: 4005-4016.
69. **Cowan, C. A. and Henkemeyer, M.** (2002). Ephrins in reverse, park and drive. *Trends in Cell Biology* **12**: 339-346.
70. **Cool, M. and Jolicoeur, P.** (1999). Elevated frequency of loss of heterozygosity in mammary tumors arising in mouse mammary tumor virus/neu transgenic mice. *Cancer Research* **59**: 2438-2444.
71. **Dietrich, W. F., Miller, J. C., Steen, R. G., Merchant, M., Damron, D., Nahf, R., Gross, A., Joyce, D. C., Wessel, M., Dredge, R. D., Marquis, A., Stein, L. D., Goodman, N., Page, D. C., and Lander, E. S.** (1994). A genetic map of the mouse with 4,006 simple sequence length polymorphisms. *Nature Genetics* **5**: 220-245.
72. **Dietrich, W. F., Miller, J., Steen, R., Merchant, M. A., Damron-Boles, D., Husain, Z., Dredge, R., Daly, M. J., Ingalls, K. A., O'Connor, T. J., Evans, C. A., DeAngelis, M. M., Levinson, D. M., Kruglyak, L., Goodman, N., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Hawkins, T. L., Stein, L., Page, D. C., and Lander, E. S.** (1996). A comprehensive genetic map of the mouse genome. *Nature* **380**: 149-152.
73. **Girard, L., Hanna, Z., Beaulieu, N., Hoemann, C. D., Simard, C., Kozak, C. A., and Jolicoeur, P.** (1996). Frequent provirus insertional mutagenesis of Notch1 in thymomas of MMTVD/myc transgenic mice suggests a collaboration of c-myc and Notch1 for oncogenesis. *Genes and Development* **10**: 1930-1944.
74. **Jiang, X., Hanna, Z., Kaouass, M., Girard, L., and Jolicoeur, P.** (2002). Ahi-1, a novel gene encoding a modular protein with WD40-repeat and SH3 domains is targeted by the Ahi-1 and Mis-2 provirus integrations. *Journal of Virology* **76**: 9046-9059.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 3.1 Structural organization of the Naad4-13 LOH region.

(A) Partial BAC contig of the Naad4-13 LOH region. BAC contigs (black bars) were identified by sib-selection, using a PCR assay with various primers in this genomic region. Some of the BAC clones were sequenced at their 5' and/or 3' ends (open bar, SP6 or T7). A few additional sequenced BAC clones (RP23-Series) (grey bar) were used to span two gaps virtually.

(B) Schematic organization of the 34 kbp EphA10 gene with its predicted 17 exons (black bars) and intronic regions (black lines). The positions of some microsatellite markers was indicated.

(C) Positions of genomic probes used for Southern blot analysis. Single-copy genomic probes were obtained by PCR amplification and used for Southern blot analysis. The length and position of the germ-line BamH1 or SacI fragments detected with the probes are indicated.

Figure 3.2 LOH analysis within the Naad4-13 region.

A schematic representation of part of the EphA10 gene with its exons (numbered) and introns is shown at the top. Tumors sharing the same LOH at each indicated marker are shown. Symbols: black boxes, LOH (the origin of allelic loss (BALB/c or C57BL/6) was indicated); white boxes, heterozygote for BALB/c and C57BL/6 alleles; **, high LOH rate (>75%); *, numbers of the nucleotide position from UCSC genome browser (May 2004); horizontal arrows at the bottom, intervals of the LOH regions.

Figure 3.3 Identification of mutated EphA10 alleles in mammary tumors.

(A) Schematic representation of the sequencing data of the EphA10 sequences, around the D4Mit279 marker. The indicated primers #1818 and 1821 were used to amplify the 1.2 kbp fragment spanning part of intron 8 (black line) and exons 9 and 10 (black boxes). The repeated sequences detected with D4Mit279 are illustrated for the parental BALB/c and C57BL/6 DNA, as well as for the mutated alleles detected in tumor 35T and 41BT.

(B) Length of the wild-type and mutated (DNA from tumor 35T) PCR products. The 1.2 kbp PCR products amplified with primers #1818 and 1821 were cloned and digested with *Dra*I and migrated on a 1.2 % agarose gel.

Figure 3.4 RT-PCR analysis of EphA10 transcripts.

(A) Available ESTs from the Databank are illustrated.

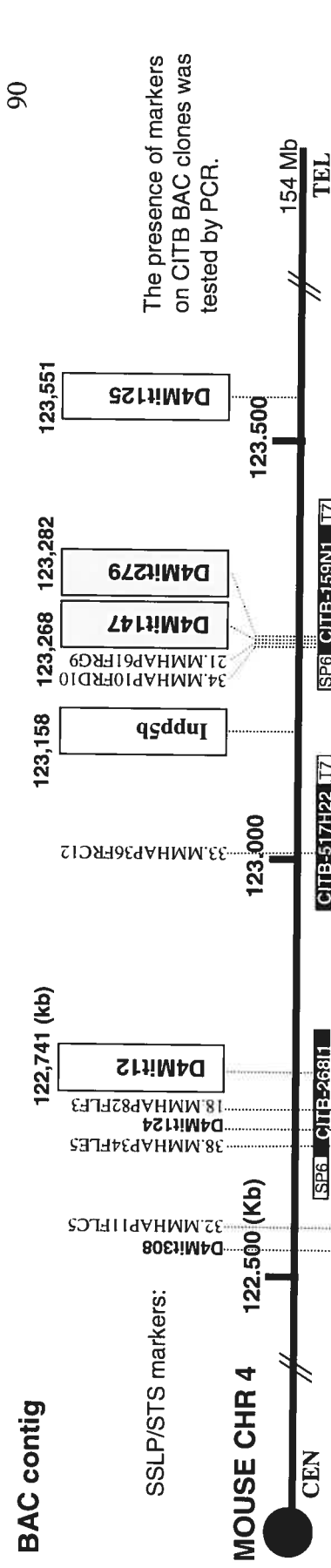
(B) EphA10 cDNA. RT-PCR was carried out with the indicated primers on RNA extracted from 293T cells transduced with the full-length EphA10 gene under the regulation of the CMV promoter. The cDNAs obtained were cloned and sequenced. Symbols: open boxes, exons with their respective numbers. Grey boxes, intronic sequences and/or alternative exons.

Figure 3.5 Northern blot analysis of EphA10 expression.

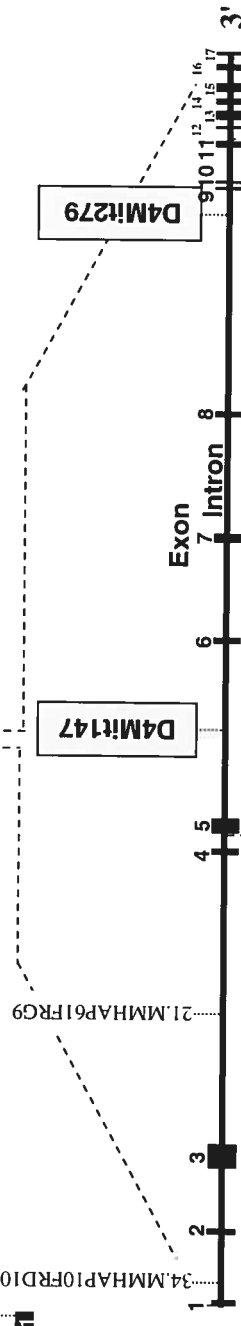
A) Northern blot analysis of EphA10 expression. RNA was collected from different tissues (brain, bone marrow, testis, lung, thymus and mammary gland) and from 293T cell transfect with cosmid CMV/EphA10^{WT}. The RNAs were hybridized with EphA10 cDNA: probe 1 EST BB633927 (exons 1-3) or probe 2 EST CA316442 (exons 6-17). The positions of the deduced EphA10 mRNA sizes (4.0 and 2.2 kb) are indicated (arrowheads).

B) Southern blot, probe 1 and 2 hybridized on genomic DNA.

A) BAC contig



B) Epha10 genomic (34 kb)



C) Southern Blot analysis

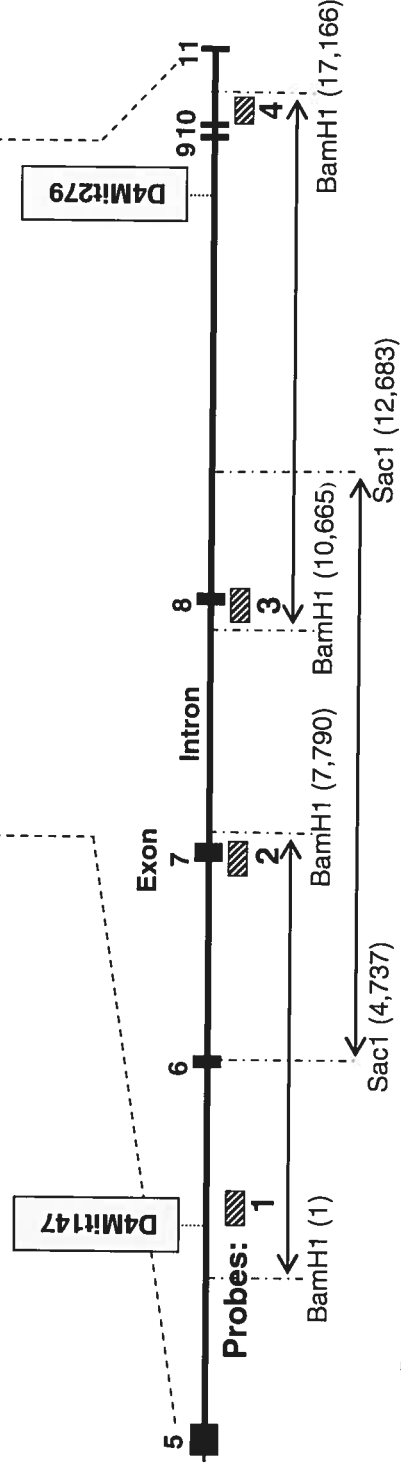


Figure 3.1 Structural organization of the Naad4-13 LOH region.

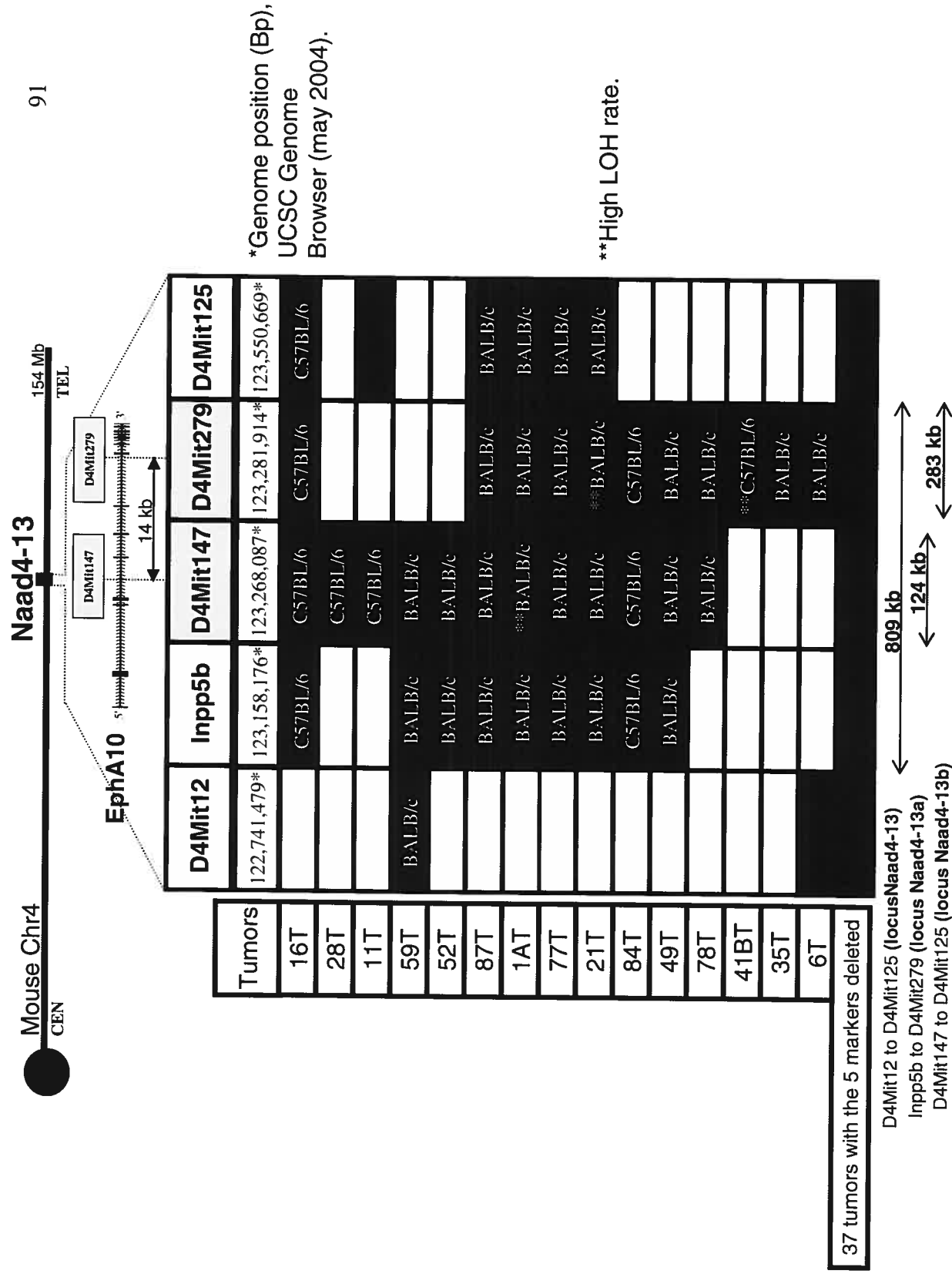


Figure 3.2 LOH analysis within the Naad4-13 region.

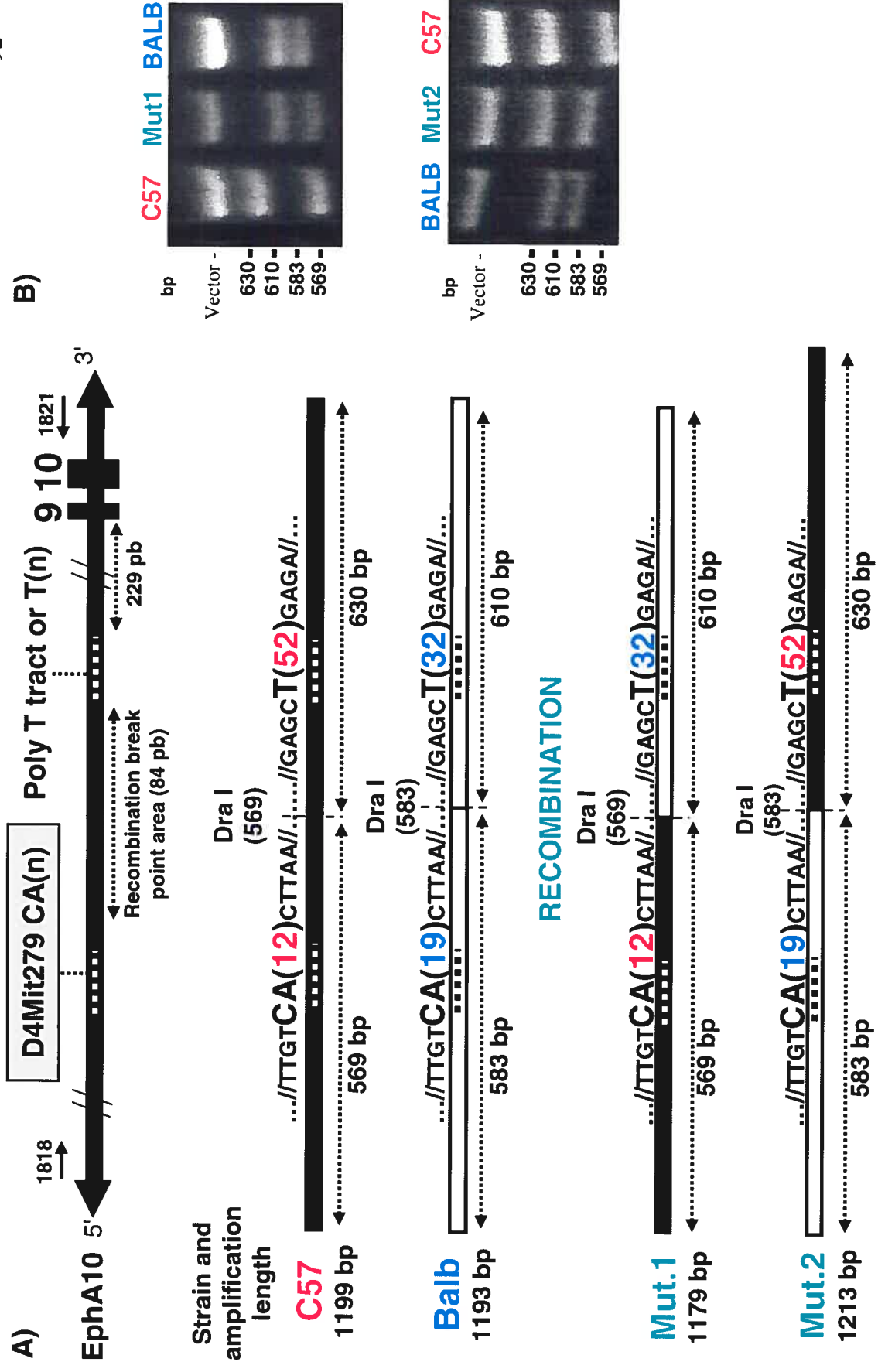
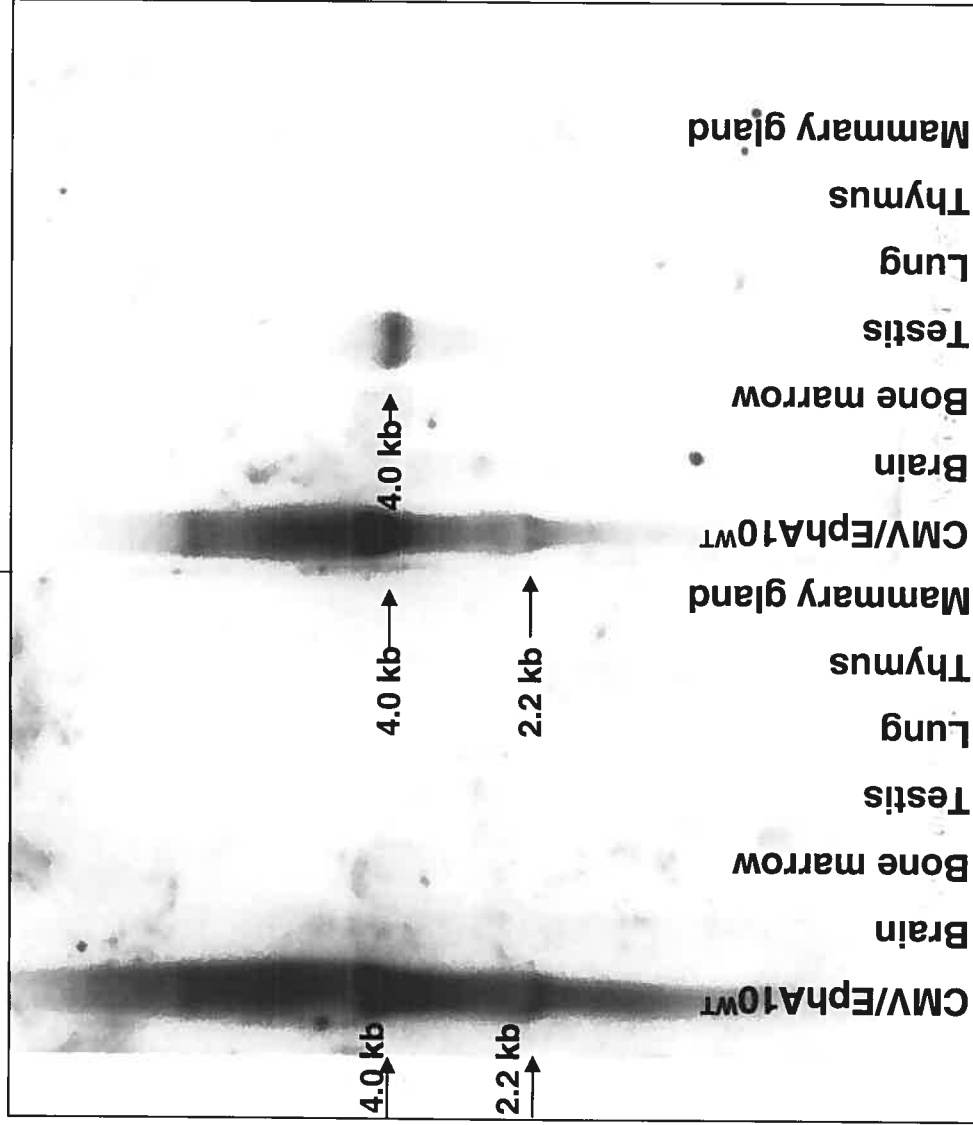


Figure 3.3 Identification of mutated EphA10 alleles in mammary tumors.

Northern blot

Probe 1 EST BB633927

Probe 2 EST CA316442



Southern blot

Probe 1

Probe 2

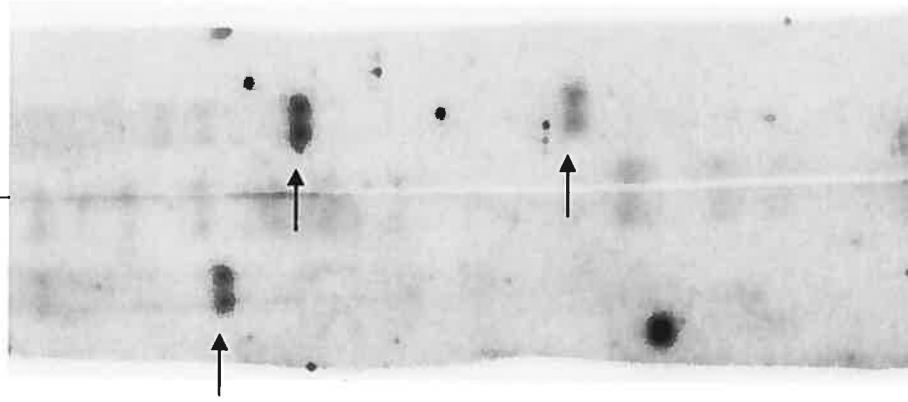


Figure 3.5 Northern blot analysis of EphA10 transcripts

CHAPITRE 4

Étude fonctionnelle du gène EphA10

Les résultats préliminaires suivants sont absents des articles de cette thèse. Ces résultats réalisés par François Depault devront être répétés et certains contrôles devront être ajoutés. De plus, certains résultats devront être corroborés par d'autres procédures expérimentales. Les résultats présentés dans le chapitre 4 sont discutés dans le chapitre 4.

4.1a Introduction

L'épissage de la forme tronquée du gène EphA10 s'effectue au même exon que les transcrits tronqués du récepteur EphA7. Ce dernier est le gène le plus analogue au gène EphA10 en termes de nucléotides et d'acides aminés. L'expression de la forme tronquée (sans domaine tyrosine kinase) du récepteur EphA7 inhibe la forme complète du récepteur EphA7 et provoque ainsi l'adhésion des cellules (Holmberg *et al.*, 2000). Nous pensons que le gène EphA10 comme EphA7, exprime une forme tronquée pouvant modifier le phénotype des cellules. De plus, nous spéculons (section 5.5) sur la possibilité que les mutations retrouvées dans les tumeurs 35T et 41BT puissent augmenter l'expression de la forme tronquée du récepteur EphA10 et provoquer éventuellement l'inhibition (section 5.8) du GST candidat EphA10. Les prochaines expériences de transfection suggèrent un scénario possible advenant la surexpression de la forme tronquée du gène EphA10 dans les tumeurs. La première expérience (section 4.2) semble démontrer que la transfection transitoire de la forme tronquée du gène EphA10 modifie le phénotype des cellules 293T (cette lignée cellulaire fut choisie car elle est facilement transfectable). La deuxième expérience (section 4.3) concerne un phénotype récurrent observé durant la transfection de la forme complète du gène EphA10 : la formation de syncytias.

4.1b Matériel et méthodes

Transfection de cellules en culture par précipitation au calcium phosphate

Passage des cellules 293T la veille de la transfection (BOSC : 3×10^6 cellules par pétri de 60 mm dans 4 ml de milieu). Avant la transfection, 25 μM de chloroquine (Sigma C-6628) est ajouté aux cellules. Les cellules confluentes à $\sim 80\%$ sont ensuite transfectées avec 10 μg d'ADN grâce à la technique de précipitation au calcium phosphate :

L'ADN (10 μg) est mélangé à 2mM de CaCl_2 . Par la suite, 500 μl de 2 X HBS est ajouté au mélange (50 mM HEPES, 10 mM KCL, 12 mM Dextrose, 280 mM NaCl, 1.5 mM Na_2HPO_4) et le tout est brassé vigoureusement. Le mélange ADN/ CaCl_2 /HBS est ajouté au pétri et les cellules sont incubées à 37°C . Le milieu est ensuite changé après 4 h pour enlever la chloroquine et les cellules sont incubées de nouveau à 37°C .

L'efficacité de transfection des expériences décrites dans les figures 4.1 et 4.2 représente en moyenne 25% des cellules du pétri.

4.1c Légendes des figures

Figure 4.1 (p 100) Répulsion ou adhésion des cellules (293T) suite à la transfection transitoire du gène EphA10.

- a) Phénotype cellulaire normal (contrôle) suite à la co-transfection d'un cosmide sans insert et d'un plasmide exprimant GFP.
- b) Cellules arrondies suite à la co-transfection du cosmide CMV/EphA10^{WT} (annexe 5) et d'un plasmide contenant GFP.
- c) Cellules avec prolongements suite à la co-transfection de la forme tronquée de EphA10 (cosmide CMV/EphA10^T, annexe 6) et d'un vecteur GFP.
- d-e) formation d'un agrégat de cellules d) en fluorescence et e) en microscopie photonique standard suite à la co-transfection de la forme tronquée de EphA10 (CMV/EphA10^T) et d'un vecteur GFP.

Figure 4.2 (p 102) Formation de syncytias dans les pétris de cellules (293T) transfectées de façon transitoire avec le cosmide CMV/EphA10^{WT}.

- a) Formation d'un petit syncytium d'environ 15 à 25 cellules, 72 h après la transfection transitoire du cosmide CMV/EphA10^{WT}.
- b) Syncytium en formation, 96 h suite à la transfection du cosmide CMV/EphA10^{WT}.
- c) Syncytium mature, 120 h suite à la transfection du cosmide CMV/EphA10^{WT}. On observe une étendue de cytoplasmes (flèche) résultant de la fusion des cellules.
- d) Exemple représentatif d'un syncytium induit par un virus : les flèches blanches indiquent les limites de cette cellule géante

Figure 4.3 (p103) La répulsion cellulaire médiée par les gènes Ephrins implique un phénomène de trans-endocytose.

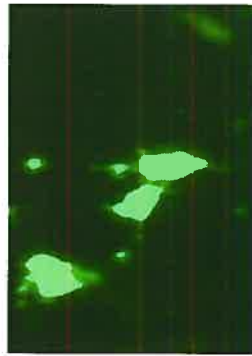
Une cellule qui exprime le ligand Ephrin, liée à une cellule qui exprime le récepteur Ephrin correspondant, subit aux points de contacts entre ces cellules, un phénomène de trans-endocytose. La membrane de la cellule qui exprime le ligand s'engouffre au sein de vésicules qui seront ingérées par la cellule qui exprime le récepteur. Ce phénomène de trans-endocytose déstabilise les liens entre les cellules et provoque la répulsion des cellules.

4.2 Le récepteur EphA10 provoquerait l'adhésion et la répulsion des cellules

La fonction du gène EphA10 dans les cellules n'est pas encore documentée. Nous supposons que la fonction de l'EphA10 est similaire à celle de la majorité des membres Ephrins : provoquer l'attraction et la répulsion des cellules. La surexpression des gènes Ephrins cause la répulsion des cellules et la rétraction des filopodes (Wilkinson, 2003). Par exemple, les cellules 293T transfectées avec Ephrin-B1 ou Ephrin-A5 deviennent rondes et comprimées (Xu *et al.*, 2003; Lawrenson *et al.*, 2002). D'un autre côté, l'expression de la forme tronquée (sans domaine tyrosine kinase) de certains récepteurs Ephrins provoque l'adhésion des cellules, favorise les prolongements cellulaires et occasionne la formation d'agrégats cellulaires (Zimmer *et al.*, 2003; Holmberg *et al.*, 2000). Dans notre laboratoire, nous observons des phénotypes similaires 48 h après la transfection transitoire de la forme génomique complète (CMV/EphA10^{WT}, annexe 5)¹² ou tronquée (CMV/EphA10^T, annexe 6) du gène EphA10 dans la lignée cellulaire 293T. La Figure 4.1 (page suivante) montre : a) des cellules normales (contrôle), b) des cellules arrondies suite à la co-transfection du cosmide CMV/EphA10^{WT} et d'un plasmide contenant GFP, c) des cellules avec de longs prolongements et d-e) la formation d'agrégats suite à la co-transfection de la forme tronquée et d'un vecteur GFP. Les prolongements cellulaires de la figure 4.1C se produisent même si les cellules ne sont pas à proximité l'une de l'autre.

¹² La construction des cosmides CMV/EphA10^{WT} et CMV/EphA10^T est décrite dans les annexes 5 et 6 et dans la section 5.6.1 et 5.6.2 de la discussion. Le cosmide CMV/EphA10^T est un sous-produit de la construction du cosmide CMV/EphA10^{Mut} (annexe 6) et contient des séquences supplémentaires dans l'exon 10 amenant l'introduction d'un codon stop. Ces expériences devront être répétées avec les cDNA du gène EphA10 car la transfection de la séquence génomique complète du gène EphA10 peut exprimer différents transcrits dans les cellules en culture.

a) Contrôle

b) EphA10^{WT} + GFPEphA10^T + GFP

c)

d)

e)

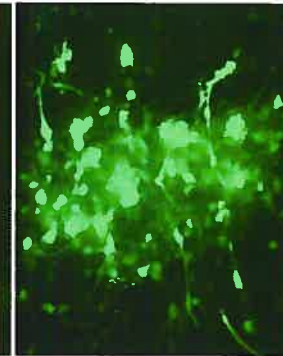
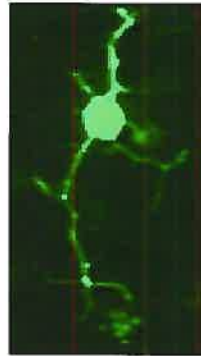
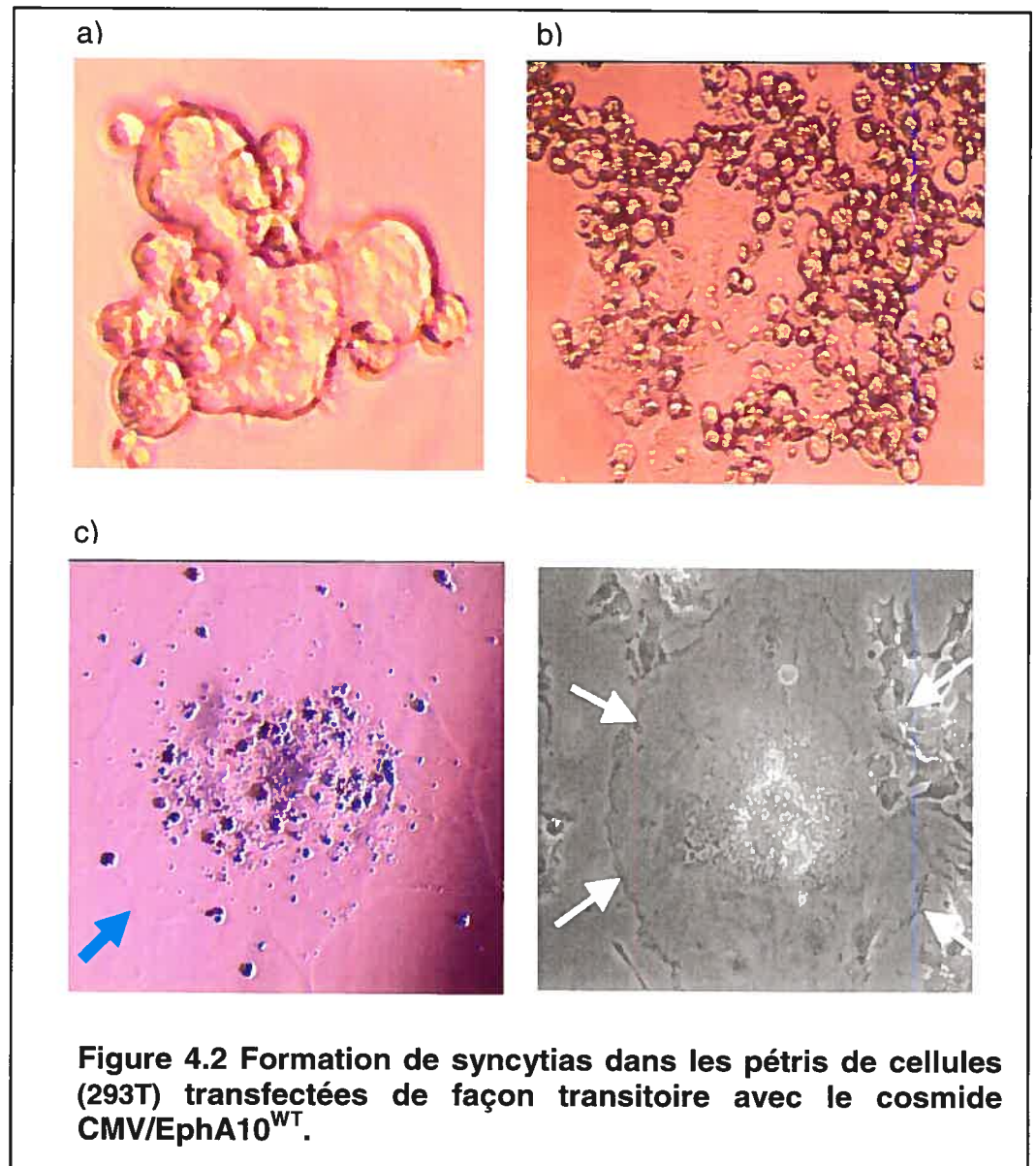


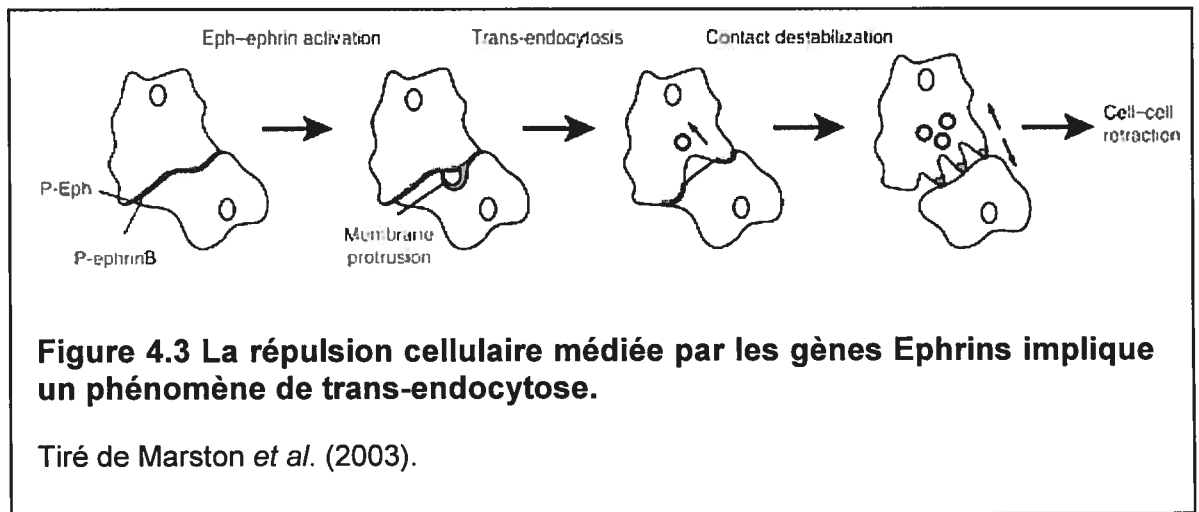
Figure 4.1 Répulsion ou adhésion des cellules (293T) suite à la transfection transitoire du gène EphA10.

4.3 Le gène EphA10 provoquerait la formation de syncytias

Nous observons dans les pétris de cellules 293T transfectées avec la construction CMV/EphA10^{WT}, l'apparition de plusieurs syncytias, suite à la fusion progressive d'une fraction (~30 %) importante des cellules du pétri (figure 4.2 b-c). On dénombre en moyenne 25 syncytias par pétri de 100 mm et ce, lors de trois transfections indépendantes. Les syncytias apparaissent 72 h après le début de la transfection. Ces syncytias demeurent présents après plusieurs jours en culture (environ 7 jours). Dans les pétris contrôles (non transfectés ou transfectés avec le vecteur vide) aucun syncytium n'apparaît.

Ce phénomène semble possible de la part d'un récepteur situé à la surface des cellules et impliqué dans la répulsion cellulaire. En effet, la répulsion cellulaire médiée par les protéines Ephrins implique un mécanisme de trans-endocytose (Figure 4.3) (Marston *et al.*, 2003; Zimmer *et al.*, 2003). Comme la trans-endocytose nécessite la fusion des membranes des cellules en contact, il est plausible que la trans-endocytose provoque dans certains contextes, la formation de syncytias. La fusion cellulaire est un processus biologique fréquent durant l'embryogenèse, période durant laquelle les membres Ephrins sont fortement exprimés (Duelli et Lazebnik, 2003 ; Baker et Antin, 2003; Coulthard *et al.*, 2002).





CHAPITRE 5

DISCUSSION GÉNÉRALE

Identification des loci LOH Naad4-13a/Naad4-13b
et clonage du gène suppresseur candidat EphA10
dans les tumeurs mammaires des souris Tg MMTV/*neu*.

5.1 La souris transgénique MMTV/*neu* (erbB2)

Les aberrations génétiques déterminent, pour une large part, les changements biologiques et cliniques observés dans le cancer. La progression du cancer du sein est reliée à une accumulation progressive d'aberrations génétiques comme l'activation d'oncogènes et l'inactivation de GST. La fréquence élevée de LOH dans les tumeurs MMTV/*neu* suggère l'inhibition de nombreux gènes suppresseurs de tumeurs, particulièrement au niveau des chromosomes 4 et 19 (Cool et Jolicoeur, 1999). Comme il existe de nombreuses similitudes histologiques entre les tumeurs mammaires des souris MMTV/*neu* et les tumeurs du sein chez l'humain, les GST identifiés dans les transgéniques MMTV/*neu* seront sûrement impliqués dans les tumeurs humaines (notamment dans les tumeurs surexprimant l'oncogène ERBB2). Les souris transgéniques MMTV/*neu* semblent un modèle pertinent pour identifier de nouveaux GST impliqués dans le cancer du sein (Jolicoeur *et al.*, 1998). Le premier objectif de cette thèse est d'identifier de nouveaux gènes supresseurs de tumeurs impliqués dans le développement des tumeurs mammaires MMTV/*neu* à l'aide de la méthode LOH.

Il est important de noter que dans la littérature, certaines régions initialement identifiées avec la méthode LOH comme démontrant une perte allélique étaient en réalité affectées par un gain de matériel de l'un des allèles. Comme la distinction entre le gain et la perte de matériel demeure problématique avec la méthode LOH, certains auteurs préfèrent utiliser le terme «allelic imbalance» (Bièche et Lidereau, 1995).

5.2 Identification d'un nouveau GST candidat dans les tumeurs MMTV/neu

Plusieurs GST encore inconnus pourraient être engagés dans le développement du cancer du sein. La cartographie des délétions à l'aide des méthodes LOH permet de localiser de nouveaux GST dans le génome des tumeurs. Dans les prochaines sections, nous passerons en revue les différentes études LOH effectuées sur les tumeurs MMTV/*neu*. Le modèle de souris transgénique MMTV/*neu* a été publié en 1989 par le groupe du Dr Jolicoeur (Bouchard *et al.*, 1989). L'identification d'un nouveau GST candidat (EphA10) dans les tumeurs MMTV/*neu* est le résultat d'une dizaine d'années de recherches répartie en 3 publications :

5.2.1 Criblage du génome des tumeurs MMTV/neu

(Cool et Jolicoeur, 1999)

L'analyse LOH est une démarche systématique dont le but est de cerner dans les génomes tumoraux, des régions LOH récurrentes et de longueurs minimales pouvant contenir des GST encore inconnus. En premier lieu, l'analyse LOH débute par le criblage complet du génome des tumeurs pour identifier les chromosomes les plus affectés. Plusieurs marqueurs microsatellites, distancés à des intervalles réguliers, sont alors sélectionnés pour couvrir l'ensemble des chromosomes. Par exemple, 3 marqueurs microsatellites espacés au 25 Mb (25, 50 et 75 Mb) permettent d'analyser les pertes alléliques (LOH) sur la portion proximale, médiane et distale d'un chromosome de 100 Mb. Le laboratoire du Dr Jolicoeur a effectué un premier criblage LOH du génome de 62 tumeurs mammaires MMTV/*neu*, à l'aide de 86 marqueurs microsatellites répartis sur l'ensemble des chromosomes. Cette étude a permis d'identifier les chromosomes 4, 8 et 19 comme étant les plus affectés.

Malgré le nombre limité de marqueurs analysés (6 au maximum) sur chacun des chromosomes, plusieurs loci LOH restreints (nommés Naad pour «Neu-associated allelic deletion») ont été découverts sur les chromosomes 4 (Naad4-1 à Naad4-5), 19 (Naad19-1 et Naad19-2) et 8 (Naad8-1 et Naad8-2).

La perte du chromosome 4 semble particulièrement fréquente (50 % des tumeurs MMTV/*neu*). Ces résultats concordent avec ceux du laboratoire du Dr Muller : 82 % des tumeurs mammaires provenant de leurs transgéniques MMTV/*neu* démontrent un LOH au

niveau du chromosome 4 (Ritland *et al.*, 1997). De même, le caryotype des tumeurs mammaires des souris transgéniques HER2/*neu* démontre des délétions chromosomiques récurrentes sur le chromosome 4 (Montagna *et al.*, 2002). Finalement, la lignée cellulaire cancéreuse MCNeuA, dérivée des tumeurs mammaires des souris MMTV/*neu*, démontre un fort pourcentage de LOH sur le chromosome 4 (Campbell *et al.*, 2002). De toute évidence, un important GST localisé sur le chromosome 4 semble coopérer avec l'oncogène *neu/erbB-2* pour le développement des tumeurs mammaires. La portion distale du chromosome 4 de souris est en syntenie avec le bras chromosomique 1p du génome humain. La perte de la région 1p est fréquente dans le cancer du sein et ne semble ni fortuite ni indirecte, mais serait le résultat de pressions sélectives dans les cellules cancéreuses (Bièche *et al.*, 1993, 1994; Schwab *et al.*, 1996; Ragnarsson *et al.*, 1999).

5.2.2 Criblage des chromosomes 4 et 19 des tumeurs MMTV/*neu*

(Cool, Depault, Jolicoeur; accepté dans la revue *Genes, Chromosomes and Cancer*)

Les loci LOH décrits par Cool et Jolicoeur (1999) demeurent larges (>10 Mb). Suite au criblage du génome, l'analyse LOH est généralement concentrée sur les chromosomes qui démontrent les pourcentages de LOH les plus élevés. Le nombre de marqueurs analysés est alors fortement augmenté sur les chromosomes sélectionnés. En théorie, la précision de l'analyse LOH est directement reliée au nombre de marqueurs utilisés. Certaines tumeurs démontrent des délétions circonscrites qui affectent des segments précis de chromosomes. Sur la base des résultats de l'article de Cool et Jolicoeur (1999), nous avons sélectionné les chromosomes 4 et 19 pour une analyse LOH plus approfondie. Nous avons analysé 61 marqueurs microsatellites (36 sur le chr. 4 et 25 sur le chr. 19) sur 93 tumeurs mammaires MMTV/*neu* (incluant les 62 tumeurs initiales et 31 nouvelles tumeurs). La perte complète (hémizygosité) du chromosome 4 et 19, c'est-à-dire la perte récurrente (LOH) d'un même allèle (BALB/c ou C57BL/6) pour tous les marqueurs d'un même chromosome, a été constatée sur 26 tumeurs pour le chr.4 et sur 26 tumeurs pour le chr. 19. De plus, cette analyse délimite 36 nouveaux loci LOH circonscrits : 22 loci (Naad4-6 à Naad4-27) sur le chr. 4 et 14 loci (Naad19-3 à Naad19-16) sur le chr. 19. Un locus LOH circonscrit se définit par un marqueur microsatellite démontrant un LOH vis à vis son contrôle et bordé, de chaque côté, par des marqueurs demeurés hétérozygotes. Ces 36 loci subdivisent les régions LOH identifiées précédemment par Cool et Jolicoeur (1999). Plusieurs tumeurs affichent un patron de LOH en mosaïque (alternance de régions LOH et de régions hétérozygotes)

sur les chr. 4 et 19. L'occurrence de recombinaisons mitotiques pourrait expliquer cette observation. Finalement, il existe un biais dans la perte des allèles selon l'origine parentale : les tumeurs démontrent une perte plus élevée de l'allèle BALB/c sur le chr. 4 et de l'allèle C57BL/6 sur le chr.19.

Concentrons-nous maintenant sur le chr. 4. Au total, 79 % des tumeurs MMTV/*neu* démontrent un marqueur LOH sur ce chromosome. Ainsi, 48 tumeurs informatives démontrent des pertes partielles et circonscrites le long de ce chromosome. Les tumeurs démontrant des pertes communes ont été regroupées (loci LOH Naad4-6 à Naad4-16). Pour la recherche d'un nouveau GST au niveau moléculaire, nous avons sélectionné un seul locus LOH sur le chromosome 4, en prenant en considération les aspects suivants :

- Les loci LOH contenant des GST connus ont été rejetés. Par exemple, le locus Naad4-11 contient déjà les gènes $p16^{\text{INK4a}}$, $p19^{\text{ARF}}$ et $p15^{\text{INK4b}}$.
- Les loci LOH les plus courts ont été favorisés : Naad4-13 (0.8 Mb) < Naad4-12 (1.1 Mb) < Naad4-6 (3.2 Mb) < Naad4-10 (3.4 Mb) < Naad4-15 (3.6 Mb), etc.
- Le nombre de tumeurs par locus LOH a été pris en considération.

Nous avons finalement choisi le locus Naad4-13 {5'- D4Mit12 (hétéro.) - Inpp5b (LOH) - D4Mit125 (hétéro.) - 3'}. Localisé dans la partie distale (D2.2) du chromosome 4, Naad4-13 (~ 800 kpb) subdivise le locus LOH LCI (~ 2 cM) décrit précédemment par Lee *et al.* (1995).

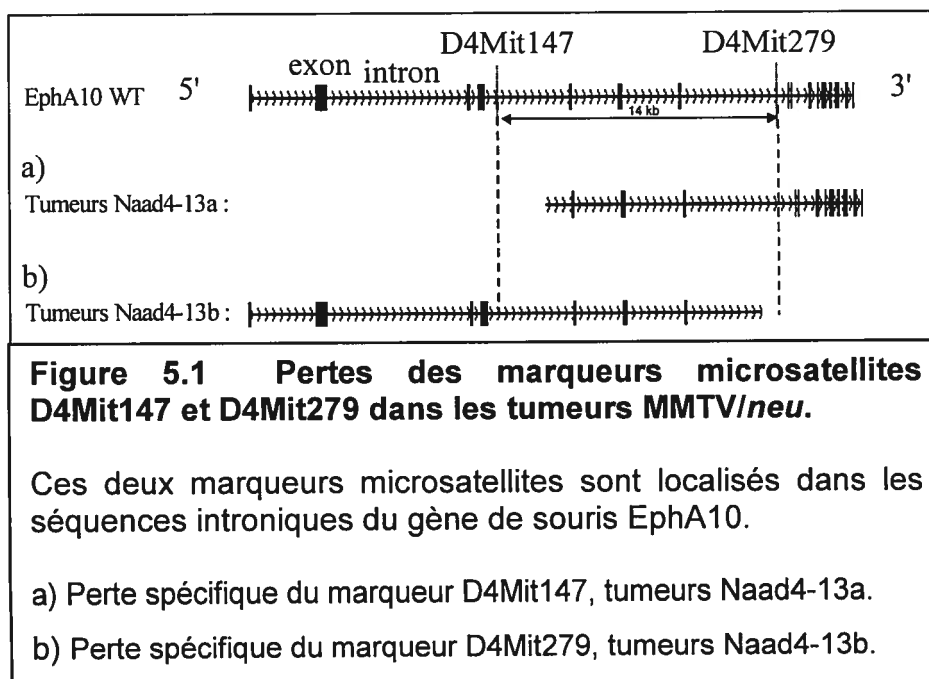
5.2.3 Criblage du locus LOH Naad4-13 et identification du gène candidat EphA10 (Depault, Cool, Hanna, Labrosse et Jolicœur ; en préparation)

Finalement, le nombre de marqueurs analysés à l'intérieur du locus sélectionné est augmenté, dans le but de raccourcir au minimum la région d'intérêt. La précision de la méthode LOH n'est alors limitée que par la disponibilité des marqueurs polymorphiques à l'intérieur de la région analysée. Nous avons ajouté deux marqueurs microsatellites supplémentaires à l'intérieur du locus Naad4-13 : D4Mit147 et D4Mit279. Ces deux marqueurs démontrent une fréquence de LOH élevée dans les 93 tumeurs MMTV/*neu*. L'ajout de ces marqueurs a permis de subdiviser le locus Naad4-13 en deux loci LOH distincts:

- Naad4-13a {5'- Inpp5b (hétéro.) - D4Mit147 (LOH) - D4Mit279 (hétéro.) -3'}
- Naad4-13b {5'- D4Mit147 (hétéro.) - D4Mit279 (LOH) - D4Mit125 (hétéro.) -3'}.

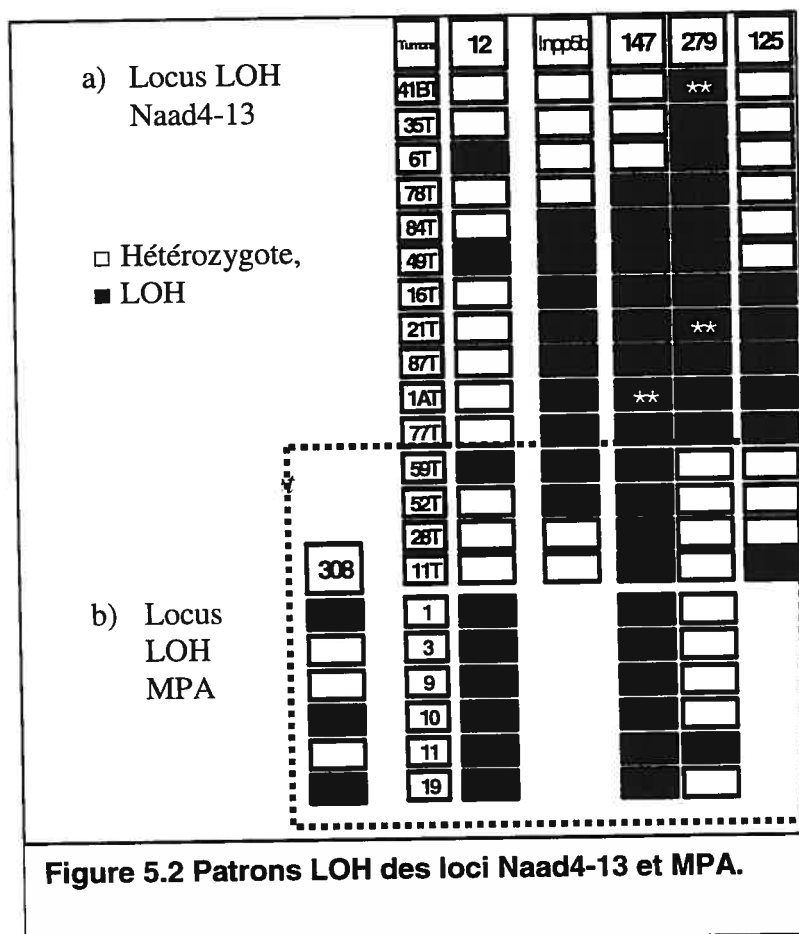
Les tumeurs du locus Naad4-13a démontrent un LOH uniquement au niveau du marqueur D4Mit147 alors que les tumeurs du locus Naad4-13b démontrent un LOH uniquement au niveau du marqueur D4Mit279. Les loci Naad4-13a et Naad4-13b ont été identifiés avant le séquençage du génome de la souris. A cette époque, la position des marqueurs dans les cartes génétiques (Whitehead Institute/MIT) était approximative.

L'apparition des cartes physiques a révélé que les marqueurs D4Mit147 et D4Mit279 sont: 1) distants de seulement 14 kb et 2) tous deux localisés à l'intérieur d'un seul et même gène : EphA10. La fréquence élevée de LOH au niveau des marqueurs D4Mit147 et D4Mit279 semble correspondre à la perte du gène EphA10 dans les tumeurs. La perte spécifique du marqueur D4Mit147 dans les tumeurs du locus Naad4-13a pourrait résulter de la perte de l'ectodomaine du gène EphA10 (Figure 5.1a). La perte spécifique du marqueur D4Mit279 dans les tumeurs de Naad4-13b pourrait correspondre à la perte de la partie 3' du gène EphA10 (Figure 5.1b). Les tumeurs du locus Naad4-13b pourraient exprimer un transcrit tronqué, sans domaine tyrosine kinase.



Il existe plusieurs similitudes entre le locus LOH Naad4-13 et le locus LOH MPA («Mouse Pulmonary Adenomas») rapporté par Benavides et ses collègues (2003). La figure 5.2 illustre : a) le patron LOH du locus Naad4-13 et b) le patron LOH du locus MPA.

Les tumeurs mammaires 59, 52, 28 et 11T du locus Naad4-13 ont perdu (LOH) le marqueur D4Mit147 situé dans la partie 5' du gène EphA10, mais conservent 14 Kb plus loin, le marqueur D4Mit279 localisé dans la partie 3' du gène EphA10. Le même phénomène se produit dans l'étude de Benavides (2003) : cinq adénomes pulmonaires (1, 3, 9, 10 et 19) démontrent une perte du marqueur D4Mit147, mais conservent le marqueur D4Mit279.



Ces résultats indiquent que la région de 14 kb localisée entre les marqueurs D4Mit147 et D4Mit279, représente un site de cassure fréquent. Il existe des régions chromosomiques où les cassures sont fréquentes. Ces régions contiennent des séquences pouvant : a) attirer certains enzymes responsables de la recombinaison et/ou b) favoriser les cassures double-brins en ouvrant la chromatine (Popescu, 2003). Une pareille région pourrait favoriser l'altération du gène EphA10, dans les tumeurs.

5.3 Recherche de mutations dans les séquences du gène candidat EphA10

La majorité des informations concernant le gène EphA10 (identifié que tout récemment) proviennent des banques de données (UCSC, NCBI). Le gène EphA10 nous semble un GST candidat intéressant à bien des égards :

1. L'homologue humain du gène EphA10 est localisé dans une région (1p34) fréquemment délétée dans le cancer du sein (Bièche *et al.*, 1993,1994).
2. EphA10 fait partie de la plus grande famille tyrosine kinase du génome, les Ephrins, impliqués dans différents types de cancers (Surawska *et al.*, 2004).
3. Certains membres des Ephrins (EphA2, EphB4, EphrinB2) sont impliqués dans la formation des glandes mammaires chez la souris (Andres et Ziemiecki, 2003).

5.3.1 Recherche de mutations dans les séquences *exoniques* du gène EphA10

Nous avons décidé de rechercher des mutations dans les exons du gène EphA10, en accord avec l'hypothèse de Knudson («two hit hypothesis»). La présence de mutations consolidera le rôle du gène EphA10 comme nouveau GST candidat. Nous avons débuté notre recherche dans l'ADN des tumeurs démontrant un LOH restreint : les tumeurs des loci Naad4-13a (11 et 28T) et Naad4-13b (6, 35, 41BT). Sur chacune de ces tumeurs, les 17 exons du gène EphA10 ont été amplifiés (PCR) et séquencés. L'annexe 2 contient les 17 paires d'amorces générées pour l'amplification PCR. Aucune mutation n'a été détectée dans les 17 exons du gène EphA10 dans les tumeurs analysées.

5.3.2 Recherche de mutations dans les séquences *introniques* du gène EphA10

Les mutations sont traditionnellement recherchées dans les exons. Les introns, souvent de tailles imposantes (plusieurs dizaines de kb), sont généralement ignorés lors de la recherche de mutations (Frayling, 2001).

Règle générale, un événement LOH est provoqué par la délétion d'un fragment chromosomique. Nos résultats (Depault *et al.*, en préparation) et ceux des autres (Benavides *et al.*, 2003), laissent supposer la présence d'un important point de cassure entre les marqueurs D4Mit147 et D4Mit279. La courte distance (14 kb) qui sépare ces marqueurs rend possible la recherche de délétions à l'aide de sondes spécifiques. Nous avons tenté de

mettre en évidence par Southern blot, des délétions pouvant affecter le gène *EphA10*, dans les tumeurs des loci Naad4-13a et Naad4-13b (Depault *et al.*, en préparation). La méthodologie et les résultats (Southern blot) de ces expériences sont présentés dans l'annexe 3. Aucune délétion n'a été détectée dans les tumeurs MMTV/*neu* analysées. De toute évidence, les LOH détectés dans les tumeurs des loci Naad4-13a et Naad4-13b, ne semblent pas provoqué par des délétions.

D'un autre côté, le patron de LOH en mosaïque (alternance de marqueurs LOH et de marqueurs hétérozygotes) observé le long du chromosome 4 de plusieurs tumeurs MMTV/*neu*, suggère fortement l'avènement de nombreux événements de recombinaisons, notamment au niveau des marqueurs D4Mit147 et D4Mit279. La littérature mentionne que les séquences microsatellites augmentent le niveau de recombinaison (Bullock *et al.*, 1986; Murphy et Stringer, 1986; Treco et Arnheim, 1986; Sargent *et al.*, 1996; Dutreix, 1997; Gendrel *et al.*, 2000). Pour sa part, la recombinaison mitotique semble être une cause fréquente de LOH (Gupta *et al.*, 1997; Shao *et al.*, 1999). Pour mettre en évidence un événement de recombinaison dans les tumeurs du locus Naad4-13b (6, 35 et 41BT), nous avons amplifié par PCR, cloné et séquencé, un segment d'ADN de 1.2 kpb¹³ entourant le marqueur D4Mit279. Ce marqueur est localisé dans l'intron 8 du gène *EphA10*. L'analyse des séquences révèle un événement de recombinaison impliquant le marqueur D4Mit279 et ce, dans deux tumeurs indépendantes (35 et 41BT) (Depault *et al.*, en préparation). Ces événements de recombinaisons sont absents des ADN contrôles (35N et 41N) provenant des même animaux. Par conséquent, les LOH observés au niveau du marqueur D4Mit279 dans les tumeurs 35T et 41BT, semblent être causés par des événements de recombinaison, spécifiques à ces tumeurs.

¹³ Le fragment de 1.2 kpb contient : une partie de l'intron 8 (905 pb), l'exon 9 (59 pb), l'intron 9 (117 pb), l'exon 10 (98 pb) et une partie de l'intron 10 (20 pb).

5.4 Mutation de l'intron 8 du gène EphA10 par recombinaison

Un accroissement de la fréquence de recombinaison mitotique augmente les chances d'apparition de LOH, mais surtout, augmente la probabilité que ces recombinaisons provoquent des changements génétiques aberrants pouvant contribuer à la carcinogenèse. Nous pensons que l'intron 8 représente un point chaud pour la recombinaison et que ces recombinaisons favorisent la mutation du gène EphA10. Le séquençage de l'intron 8 dans les tumeurs 35T et 41BT montre que le gène EphA10 est muté suite aux événements de recombinaison (Depault *et al.*, en préparation). Les recombinaisons modifient deux séquences répétées de l'intron 8 : la séquence répétée microsatellite D4Mit279 ou (CA)_n et une séquence répétée poly-T ou (T)_n:

Normalement, la longueur des séquences répétées de (CA)_n et de (T)_n de l'intron 8 du gène EphA10 varie selon les souches des souris:

C57BL/6 sauvage : CA 12 / T 52 (76 nucléotides au total)

BALB/c sauvage : CA 19 / T 32 (70 nt au total)

On observe dans les tumeurs 35T et 41BT, une nouvelle répartition des séquences répétées de l'intron 8:

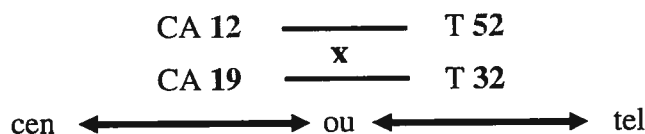
Mutant 1 (tumeur) : CA 12 / T 32 (56 nt au total)

Mutant 2 (tumeur) : CA 19 / T 52 (90 nt au total)

Ces deux allèles mutants (Mutant1 et mutant2) ont été retrouvés dans les tumeurs 35T et 41BT. Cette nouvelle répartition des séquences semble causée par un événement de recombinaison (x) survenu dans les tumeurs au niveau du marqueur D4Mit279 ou au niveau de la séquence poly-T :

CA 12 / T 52		CA 12 / T 52
CA ^x 19 / T 32	ou	CA 19 / T ^x 32

Il est également possible que cette recombinaison soit survenue dans les séquences (84 nt) qui séparent les répétitions de (CA)_n et de (T)_n. La recombinaison pourrait impliquer un fragment d'ADN orienté vers le centromère (modification de la répétition de CA) ou vers le télomère (modification de la répétition de T) :



Quoi qu'il en soit, en étudiant en détail les séquences répétées de (CA)_n et de (T)_n dans l'intron 8 du gène EphA10 des souches sauvages C57BL/6 et BALB/c, on observe que ces répétitions semblent être en état d'équilibre quant au nombre total de nucléotides. En effet, le nombre total de nucléotides (nt) entre les souches C57BL/6 et BALB/c ne varie que de 6 nt (70 versus 76 nt) et ce, malgré une importante variation du nombre de répétition de CA (12 versus 19) et de T (32 versus 52) entre les deux souches de souris. Cet effet compensatoire laisse supposer un rôle important de ces séquences répétées, notamment au niveau structural. On sait maintenant que l'hélice décrite par Watson et Crick (B-DNA) ne représente qu'une des configurations possibles de l'ADN (Rich et Zhang, 2003). Les répétitions de (CA)_n forment des structures spéciales appelées Z-DNA (Naylor et Clark, 1990; Rothenburg *et al.*, 2001). De leur côté, les séquences répétées poly-thymines (T)_n adoptent une structure inhabituelle nommée «T-tract structure» (Suter *et al.*, 2000). Dans les tumeurs mammaires MMTV/*neu*, le nombre de nucléotides se trouve profondément affecté suite aux événements de recombinaison : il est réduit à 56 nucléotides chez le mutant1 et augmente à 90 nucléotides chez le mutant 2. Cette modification du nombre de nucléotides pourrait causer un changement de structure important au sein de l'intron 8. Ce changement de structure, survenant 120 pb en amont de l'exon 9, pourrait modifier l'expression du gène EphA10. Ces événements de recombinaison engendrent deux allèles mutants différents : le mutant1 (CA12/T32) et le mutant2 (CA19/T52). L'un ou l'autre de ces allèles, peut-être même les deux, pourrait promouvoir la malignité.

5.5 La mutation de l'intron 8 pourrait modifier l'expression du gène EphA10

La mutation de l'intron 8 du gène EphA10 implique une séquence répétée de (CA)_n et de (T)_n. La littérature rapporte que :

- Les répétitions de (CA)_n peuvent agir comme des répresseurs ou des activateurs de la transcription (Nordheim et Rich, 1983; Hamada *et al.*, 1984; Berg *et al.*, 1989; Santoro *et al.*, 1984; Naylor et Clark, 1990; Shimajiri *et al.*, 1999; Rothenburg *et al.*, 2001). De même, les répétitions de (T)_n peuvent interférer dans l'enroulement de l'ADN au sein des nucléosomes et influencer la transcription (Suter *et al.*, 2000; Clancy et Hannah, 2002). Différentes longueurs de répétitions poly(T), possèdent des stabilités différentes au sein des nucléosomes (Suter *et al.*, 2000).
- Les répétitions de (CA)_n peuvent augmenter l'épissage des transcrits. Une répétition de CA de l'intron 13 du gène humain eNOS («endothelial nitric oxide synthase gene») fonctionne comme un «intronic splicing enhancer» dont l'activité dépend directement du nombre de CA (Hui *et al.*, 2003a, 2003b). De même, le raccourcissement des répétitions introniques de (T)_n dans les tumeurs provoque l'apparition de transcrits aberrants (Ejima *et al.*, 2000).
- Finalement, les séquences répétées de (CA)_n et de (T)_n peuvent coopérer pour réguler l'expression génique. Plusieurs groupes ont démontré qu'une répétition intronique de TG (CA sur le brin complémentaire) coopère avec une répétition intronique poly(T), pour réguler l'expression du gène responsable de la fibrose kystique : CFTR («Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator») (Niksic *et al.*, 1999; Pagani *et al.*, 2000). L'exon 9 du gène CFTR est sujet à un épissage facultatif qui influence le transcrit et l'évolution de la maladie. La régulation de l'épissage s'effectue dans l'intron 8 au niveau d'une séquence répétée de T (T₅, T₇, T₉) et d'une séquence répétée de TG (TG₉, TG₁₀, TG₁₁, TG₁₂, TG₁₃). Un nombre réduit de T et un nombre élevé de TG induit le «skipping» de l'exon 9.

Fort de ces évidences, nous avons jugé pertinent d'étudier les conséquences de la mutation de l'intron 8 sur l'expression du gène EphA10. Comme les tumeurs 35T et 41BT sont en quantités limitées, nous avons premièrement développé un modèle d'étude *in vitro*.

5.6 Modèle d'étude *in vitro* pour déterminer l'impact de la mutation de l'intron 8 sur l'expression du gène EphA10

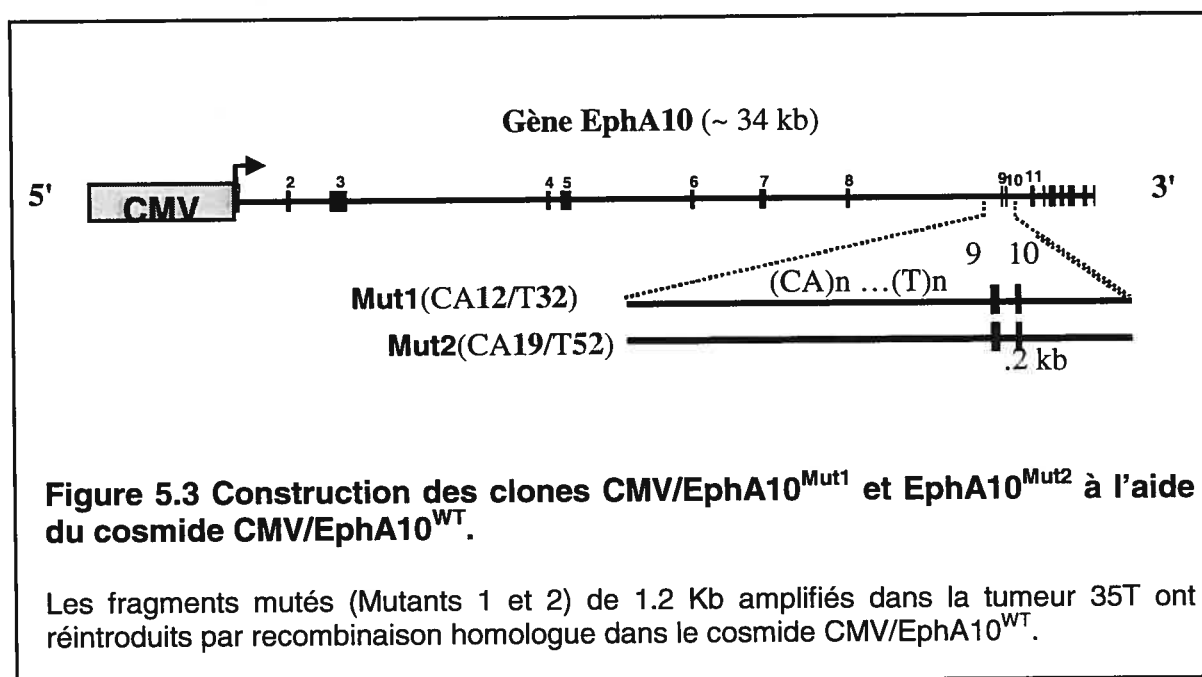
Nous avons tout d'abord cloné le gène EphA10 pour pouvoir manipuler ses séquences au niveau moléculaire.

5.6.1 Clonage du gène candidat EphA10

Nous avons construit un contig BAC couvrant la région Naad4-13 (Depault *et al.*, en préparation). Le criblage de la librairie de BAC CitbCJ7 (Research Genetics) et la description du contig Naad4-13 sont présentés dans l'annexe 4. Nous avons localisé par PCR les marqueurs D4Mit147 et D4Mit279 sur le clone BAC CITB-159N1. D'autres marqueurs du gène EphA10 (34.MMHAP.SEQ et 21.MMHAP.SEQ) ont également été localisés sur ce même clone. De toute évidence, le BAC 159N1 contient la totalité des séquences du gène EphA10 (~ 34 kb). Nous avons donc utilisé le clone 159N1 comme matrice pour cloner la séquence génomique complète du gène sauvage EphA10 (~ 34 kb) dans un vecteur cosmide, en aval du promoteur CMV (construction : CMV/EphA10^{WT}). Le clonage a été effectué par *recombinaison homologue* entre le clone BAC 159N1 et un vecteur récipient, selon la méthode décrite par Liu *et al.* (2003). Cette méthode implique l'introduction par électroporation du clone BAC et du cosmide récipient dans la souche bactérienne recombinante EL350. Les étapes de ce clonage sont présentées dans l'annexe 5. L'expression de la construction CMV/EphA10^{WT} semble adéquate car différents cDNA d'EphA10 ont été clonés à partir de l'ARN des cellules transfectées.

5.6.2 Réintroduction des mutations de l'intron 8 dans le gène EphA10

Nous avons construit deux cosmides additionnels contenant le gène EphA10 muté. Pour ce faire, nous avons introduit par *recombinaison homologue* dans le cosmide CMV/EphA10^{WT}, les fragments mutants (section 5.3.2) amplifiés dans l'intron 8 de la tumeur 35T. Deux différentes constructions ont été générées: CMV/EphA10^{Mut1} (mutant 1 : CA12/T32) et CMV/EphA10^{Mut2} (mutant 2 : CA19/T52) (Figure 5.3). Les différentes étapes nécessaires à l'élaboration de ces constructions sont présentées dans l'annexe 6.



5.7 Surexpression du gène EphA10 (normal et muté) dans les cellules en culture

Nous avons finalement transfecté de façon stable et transitoire, les constructions CMV/EphA10^{WT}, CMV/EphA10^{Mut1} et CMV/EphA10^{Mut2} dans des cellules 293T, des cellules mammaires transformées Hs578T et des cellules mammaires immortelles HC11. À l'aide de ces transfections, nous tentons présentement d'évaluer les conséquences de la mutation de l'intron 8 sur l'expression du gène EphA10 et ce, de manière qualitative (épissage de l'ARN) et quantitative (niveau d'expression des différents transcrits). Pour ce faire :

- Les cellules transfectées sont récoltées et l'ARN total est extrait (Trizol-chloroforme) des cellules. La nature et l'intensité des transcrits sont évalués par RT-PCR, Northern blot et séquençage. Les transcrits provenant des constructions CMV/EphA10^{Mut1} et CMV/EphA10^{Mut2} sont comparés aux transcrits des cellules transfectées avec le cosmide CMV/EphA10^{WT}. Malheureusement, ces résultats ne sont pas encore complétés, mais seront incorporés dans l'article de Depault *et al.*, en préparation.
- Lorsque les effets des mutations seront bien cernés dans ce système, nous examinerons si des effets comparables peuvent être observés dans l'ARN des tumeurs MMTV/*neu* comportant les mutations (35T et 41BT). Ce matériel (tumeurs) est en quantité limité.

5.7.1 Expression du gène EphA10 normal

Plusieurs récepteurs Ephrins démontrent un patron d'expression complexe par la production de différents transcrits, impliquant divers domaines de la protéine (liaison au ligand, fibronectine, tyrosine kinase, SAM). Toutefois, certains transcrits semblent récurrents. Par exemple, plusieurs récepteurs Ephrins encodent : une forme complète, une forme soluble (ectodomaine) et une forme tronquée sans domaine kinase.

Le gène EphA10 possède 17 exons chez la souris et chez l'humain (EPHA10). Dans les banques de données, les EST des gènes EphA10/EPHA10 sont peu nombreux (20<) et proviennent principalement du cerveau. Il n'existe aucun cDNA complet comprenant les 17 exons des gènes EphA10/EPHA10, on retrouve toutefois un cDNA codant pour la forme soluble (exons 1-3), chez la souris (A330090H18) comme chez l'humain (FLJ33655). À partir de l'ARN des cellules en culture transfectées avec la construction CMV/EphA10^{WT}, nous avons étudié en détails (RT-PCR) l'expression du gène de souris EphA10 (Depault *et al.*, en préparation). Ces résultats vont permettre de mieux comprendre les effets possibles des différentes mutations sur l'expression du gène EphA10. Nous avons séquencé plusieurs nouveaux transcrits du gène EphA10. Nous sommes incapables d'amplifier un cDNA complet contenant les 17 exons du gène EphA10. Néanmoins, nous sommes les premiers à cloner un transcrit tronquée (sans domaine kinase) du gène EphA10.

5.7.1.1 Identification de la forme tronquée du gène EphA10

Nous avons identifié la forme tronquée du gène EphA10 par : a) une étude des EST provenant des banques de données et b) une analyse RT-PCR utilisant l'ARN des cellules 293T transfectées avec la construction CMV/EphA10^{WT}.

a) Étude des EST des banques de données (UCSC, NCBI)

- cDNA contenant les séquences du domaine tyrosine kinase :

Les EST CA316422 et BY718495 représentent des cDNA contenant les séquences (exons) du domaine tyrosine kinase. Ces EST sont épissés au bout 3' («splice donor») de l'exon 10 du domaine juxtamembranaire jusqu'aux séquences en 5' («splice acceptor») de l'exon 11 du domaine tyrosine kinase.

- cDNA tronqués sans domaine kinase :

Les EST BY362139, BY363197, BY363225 représentent des cDNA tronqués du récepteur EphA10. Ces trois ESTs ne sont pas épissés au bout 3' de l'exon 10 et leurs séquences se terminent plus loin dans l'intron 10 (codon STOP).

b) Analyse RT-PCR

- cDNA contenant les séquences du domaine tyrosine kinase :

Nous avons amplifié (RT-PCR amorces : 1649-1648; annexe 2), cloné et séquencé un cDNA contenant les séquences du domaine kinase à partir de l'ARN des cellules 293T transfectées avec le cosmide CMV/EphA10^{WT}. Cet EST est épissé en 3' de l'exon 10 jusqu'aux séquences de l'exon 11 (domaine kinase).

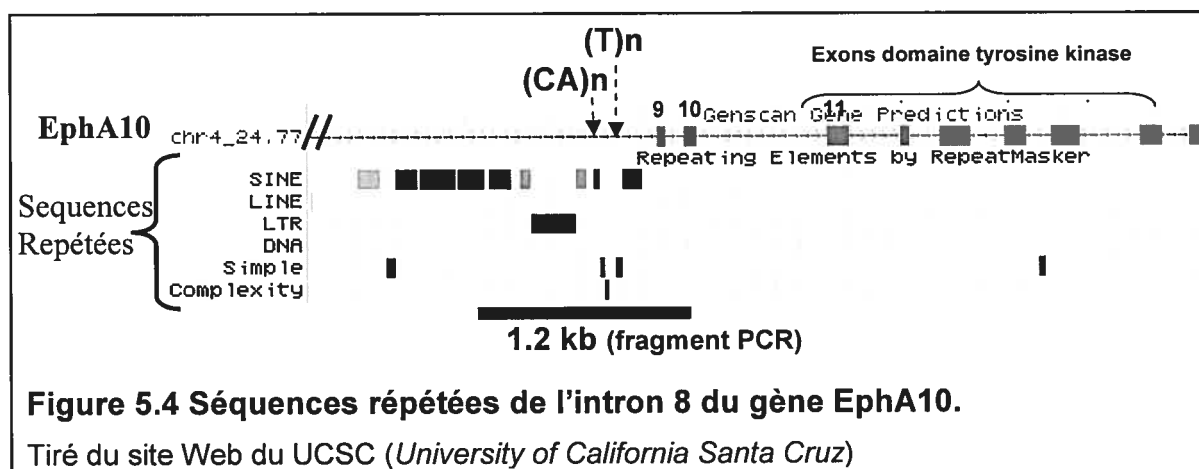
- cDNA tronqués sans domaine kinase :

Dans les banques de données, trois courts EST sont présents dans l'intron 10 du gène EphA10 : BE983848, BE995180, BM941659. Nous avons généré une amorce anti-sens (2188, Annexe 2) à partir des séquences de ces EST, dans le but d'amplifier différents transcrits tronqués du gène EphA10. Plusieurs cDNA tronqués ont été amplifiés par RT-PCR (amorces sens : 2230 ou 2191; amorces anti-sens : 2188), clonés et séquencés à partir de l'ARN des cellules 293T transfectées avec le cosmide CMV/EphA10^{WT} (Depault *et al.*, en préparation). Ces transcrits ne sont pas épissés au bout 3' de l'exon 10 mais continuent dans l'intron 10 et se terminent à l'amorce 2188. Pour confirmer la découverte de ce transcrit tronqué, nous avons amplifié (RT-PCR) et séquencé avec succès à l'aide des mêmes amorces (2191-2188), un transcrit identique à partir de l'ARN du cerveau d'une souris sauvage C57BL/6.

De toute évidence, un mécanisme d'épissage alternatif au bout 3' de l'exon10 régule l'expression de la forme complète et de la forme tronquée du récepteur EphA10.

5.8 Hypothèse concernant la forme tronquée et la mutation de l'intron 8 du gène EphA10

Nous ne connaissons pas encore les conséquences exactes de la mutation de l'intron 8 sur l'expression du gène EphA10. Toutefois, nous savons désormais que le gène EphA10 encode pour une forme tronquée sans domaine tyrosine kinase. Selon Holmberg et ses collègues (2000), la forme tronquée du récepteur EphA7 modifie le phénotype (adhésion versus répulsion) des cellules en culture. En effet, EphA7 tronquée inhibe la phosphorylation du récepteur «full-length» EphA7 et provoque l'adhésion des cellules. Le chapitre 4 de cette thèse présente certaines évidences expérimentales démontrant que la transfection de la forme tronquée du récepteur EphA10 provoque également l'adhésion des cellules en culture. Notre hypothèse est donc la suivante : il est possible que la mutation de l'intron 8 du gène EphA10 puisse influencer l'expression et/ou l'épissage alternatif de la forme tronquée du récepteur EphA10. L'intron 8 du gène EphA10 contient un important groupe de séquences répétées en amont de l'exon 9 (Figure 5.4).



Nous pensons que ce groupe de séquences répétées (notamment les séquences répétées de Ca et de T) puisse réguler l'épissage de la forme tronquée du récepteur EphA10. Si la mutation de l'intron 8 favorise l'épissage ou la transcription de la forme tronquée du gène EphA10, cette forme pourrait agir comme dominant négatif sur l'allèle sauvage pour provoquer l'inhibition complète du récepteur EphA10 («loss-of-function») et favoriser le développement des tumeurs. Par exemple, Noren et ses collègues (2004) rapportent que la co-injection d'une forme tronquée du récepteur EphB4 augmente la croissance des tumeurs mammaires induites chez les souris nues.

Les résultats démontrant les effets de la mutation (recombinaison) du gène EphA10 ne sont pas encore disponibles. Par conséquent, il demeure important de mentionner l'aspect spéculatif des hypothèses de la section 5.8. Pour le moment, aucune évidence ne démontre que les mutations des tumeurs 35T et 41BT modifie l'expression ou provoquent l'inactivation du gène EphA10. Comme les séquences microsatellites répétées (CA et polyT) sont plus aptes à la recombinaison, il demeure toujours possible que la mutation de l'intron 8 du gène EphA10 ne soit en fait qu'un phénomène de recombinaison sans conséquence directe sur l'activité du gène. Cette question sera sûrement résolue par l'étude de l'ARN des tumeurs 35T et 41BT. Il sera alors possible de vérifier directement la présence de nouveaux messagers et/ou la modification des niveaux de transcription.

5.9 Réarrangements affectant le gène EPHA10 dans les tumeurs humaines

Voici maintenant quelques évidences pouvant impliquer le gène EPHA10 dans la carcinogénèse des tumeurs humaines.

5.9.1 Surexpression du gène EPHA10 dans les lignées tumorales du sein

Fox *et al.* (2004) ont analysé par RT-PCR, l'expression du gène EPHA10 (et d'autres membres des Ephrins) dans trois lignées cellulaires humaines dérivées du sein : MCF-10A provenant de l'épithélium normal, MCF7 dérivé d'un carcinome non invasif et MDA-MB-231 provenant d'un carcinome invasif. Le gène EPHA10 ne semble pas exprimé dans la lignée cellulaire normale MCF-10A, mais fortement exprimé dans la lignée tumorale MCF7 et modérément exprimé dans la lignée tumorale MDA-MB-231.

Les données brutes provenant du site Web Geo («Gene expression omnibus») du NCBI, utilisant une puce à ADN humain (Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Array Set HG-U133B) démontrent une faible expression (se rapprochant du bruit de fond) du gène EPHA10 dans des cellules épithéliales du sein normal mais une forte expression dans les lignées cellulaires cancéreuses du sein MDA-MB-436 et HCC1954.

5.9.2 LOH au niveau du locus EPHA10 dans les tumeurs humaines

Selon notre hypothèse, le gène souris EphA10 représente un excellent GST candidat. Ce gène est localisé dans la partie distale du chromosome 4 (D2.2) de souris, en syntenie avec la région 1p34 du génome humain. Le bras chromosomique 1p est fréquemment délété dans les tumeurs. Nous avons cherché dans la littérature, des tumeurs ou lignées cellulaires humaines démontrant des LOH au niveau de la région 1p34. Dans un article intitulé «Deletion Mapping on the short arm of chromosome 1 in Merkel Cell Carcinoma», plusieurs tumeurs (MCC) ou lignées cellulaires (MCCTC) humaines démontrent un LOH au niveau du marqueur microsatellite D1S186 (Leonard *et al.*, 2000). Le marqueur D1S186 est localisé dans le promoteur du gène humain EPHA10. La perte du marqueur D1S186 correspond probablement à la perte du gène candidat EPHA10. La figure 1 de cet article rapporte plusieurs tumeurs (MCC18, 26, 1) et lignées cellulaires (MCCTC5, TC14/2) démontrant des pertes circonscrites impliquant le marqueur D1S186. Dans le cas de la lignée cellulaire MCCTC5, la perte du marqueur D1S186 s'avère spécifique : les

marqueurs adjacents demeurent hétérozygotes. A notre connaissance, cet article présente chez l'humain, le locus LOH le plus contigu au locus Naad4-13. A notre demande, le Dr Leonard nous a fait parvenir des échantillons d'ADN provenant des tumeurs et des lignées cellulaires MCC.

Finalement, une autre étude LOH chez l'humain a retenu notre attention. Suite à une analyse de neurocytomes (tumeur rare affectant les neurones), Tonk *et al.* (2000) rapporte une délétion homozygote au niveau du marqueur D1S186.

5.9.3 Mutation du gène EPHA10 dans les tumeurs humaines

Tout récemment, une mutation du gène humain EPHA10 a été rapportée dans un carcinome canalaire, suite à une analyse des séquences codantes des gènes tyrosines kinases dans le génome de 25 tumeurs du sein (Stephens *et al.*, 2005). Cette mutation modifie un acide aminé de l'exon 11 (domaine tyrosine kinase) du gène EPHA10.

Toutes ces évidences renforcent l'implication possible du gène candidat EphA10 dans les tumeurs. Ce paragraphe termine la discussion, passons maintenant aux expériences projetées (chapître 6) avant de conclure (chapître 7).

CHAPITRE 6

EXPÉRIENCES FUTURES

L'identification d'un nouveau gène supresseur de tumeurs candidat au sein du génome des tumeurs n'est que le début d'un long processus. Nous devons maintenant prouver expérimentalement l'implication du candidat EphA10 dans les tumeurs. Pour ce faire, nous avons envisagé plusieurs expériences.

6.1 Expériences in vitro

6.1.1a Étude de l'expression du gène EphA10 dans les tumeurs 35T et 41BT

Analyse par RT-PCR et Northern blot de nouveaux transcrits et/ou d'une modification des niveaux de transcription dans l'ARN des tumeurs mutées 35T et 41BT.

6.1.1 Recherche de mutations dans le gène de souris EphA10

Nous avons séquencé l'intron 8 du gène EphA10 dans seulement 3 tumeurs (6, 35 et 41BT) du locus Naad4-13b (section 5.3.2). Comme le gène EphA10 représente un excellent GST candidat, il sera possible de retourner aux tumeurs MMTV/*neu* démontrant des délétions plus larges de cette région du chromosome 4. En fait, 52 des 93 (56%) tumeurs MMTV/*neu* démontrent un LOH incluant le locus EphA10. Les séquences répétées de l'intron 8 du gène EphA10 seront examinées sur ces 52 tumeurs. De plus, comme l'exon 11 du gène EPHA10 semble muté dans les tumeurs humaines du sein, nous allons séquencer l'exon 11 de nos 93 tumeurs mammaires MMTV/*neu* pour rechercher une mutation similaire. Si de nouvelles mutations sont découvertes, elles pourront être réintroduites par recombinaison homologue dans le cosmide CMV/EphA10^{WT}.

6.1.2 Recherche de mutations dans le gène humain EPHA10

La découverte de mutations dans les tumeurs humaines renforcera le rôle du gène EPHA10 comme nouveau GST. Nous avons généré des amorces pouvant amplifier les 17 exons du gène humain EPHA10 (Annexe 2). Nous avons également généré des amorces (2189-2190) pouvant amplifier chez l'humain une région correspondante à l'intron 8 (fragment de 1.2 kb) du gène de souris EphA10. Ces amorces seront utilisées pour la recherche de mutations dans :

- l'ADN des lignées tumorales mammaires humaines MCF7, MDA-MB-231, MDA-MB-436 et HCC1954. Ces lignées démontrent une surexpression du gène EPHA10 (section 5.9.1).
- l'ADN des tumeurs et des lignées cellulaires MCC. Les tumeurs MCC démontrent des pertes circonscrites au niveau du locus humain EPHA10 (section 5.9.2).

6.1.3 Étude sur l'expression du gène EphA10 dans les glandes mammaires

Nous allons valider par RT-PCR et Northern-blot, la présence dans les glandes mammaires de chaque transcrit du gène EphA10 isolé à partir de l'ARN des cellules transfectées avec le cosmide CMV/EphA10^{WT} et ce, à différents stades de différenciation (naissance, puberté, gestation, lactation). Le site Web du NCBI (Unigene) rapporte l'expression du gène humain EPHA10 dans les glandes mammaires.

6.1.4 Impact de la surexpression du gène EphA10 sur le phénotype des cellules

Dans la section 4.1 et 4.2 (résultats préliminaires), nous avons commencé à étudier les effets de la surexpression du gène EphA10 sur le phénotype des cellules en culture (adhésion, répulsion, apparition de syncytias). Nous voulons maintenant évaluer l'impact de la surexpression des constructions CMV/EphA10^{WT}, CMV/EphA10^{Mut1} et CMV/EphA10^{Mut2} sur certains paramètres précis comme le taux de croissance des cellules et le développement de colonies en agar. Nous pourrions également co-transfecter le cDNA muté du gène *neu/erbB2* pour étudier les effets d'une possible coopération entre le gène *neu/erbB2* et EphA10.

6.2 Expériences *in vivo*

Le gène EphA10 muté peut-être incapable de provoquer des effets dans les essais *in vitro*. Malgré leurs pertinences, les modèles *in vitro* possèdent de nombreuses limitations et ne peuvent remplacer les modèles *in vivo*. Une propriété surprenante des Ephrins est leur signalement bi-directionnel (Cowan et Henkemeyer, 2002 ; Davy et Soriano, 2005 ; Murai et Pascale, 2003). Les signaux sont transmis non seulement dans la cellule du récepteur («forward signaling») mais également transmis dans la cellule du ligand («reverse signaling»). Il semble donc pertinent de reproduire la mutation du gène EphA10 dans un contexte physiologique pour détecter certains effets paracrines.

6.2.1 Transplantation des cellules surexprimant EphA10 dans les souris nues

Nous allons transplanter (injection sous-cutanée) dans les souris nues, les cellules transfectées de manières stables avec les constructions CMV/EphA10^{WT}, CMV/EphA10^{Mut1} et CMV/EphA10^{Mut2} et observer le développement de tumeurs.

6.2.2 Création d'une souris transgénique MMTV/EphA10^{Mut}

Nous pourrions éventuellement générer une souris transgénique surexprimant le transgène EphA10^{Mut} au sein des glandes mammaires (MMTV/EphA10^{Mut}). Si ces souris transgéniques ne souffrent pas de tumeurs après 1 an, nous pourrions les croiser avec les souris Tg MMTV/*neu* (MMTV/EphA10^{Mut} x MMTV/*neu*) et évaluer l'impact sur la latence des tumeurs mammaires.

6.2.3 Création d'une souris EphA10 «knock-out»

Finalement, si nous détenons la preuve que l'allèle EphA10^{WT} est inhibé par l'allèle EphA10^{Mut}, nous pourrions générer un «knockout» conditionnel du gène EphA10 dans les glandes mammaires (système *cre-lox*).

CHAPITRE 7

CONCLUSION

Contrairement aux infections, le cancer est un mal inhérent à l'organisme venant de l'intérieur plutôt que de l'extérieur. Avec l'âge, le génome des cellules démontre une accumulation d'anomalies génétiques qui menacent l'équilibre cellulaire. Certaines cellules finissent par se dérégler et perdent le contrôle de leur prolifération. Le système immunitaire est souvent incapable de détruire ces cellules aberrantes, qui peuvent alors former une tumeur.

Malgré l'énorme quantité d'informations générées par le Projet Génome, le principal défi demeure encore aujourd'hui d'identifier les gènes responsables des maladies. La science moderne tente de caractériser les cellules malignes qui démontrent entre autres, une inhibition de leurs gènes suppresseurs de tumeurs. Le génome des tumeurs démontre un nombre élevé de délétions. Quels sont les gènes localisés sur les bras chromosomiques délétés qui sont impliqués dans le développement du cancer du sein? Pour découvrir ces gènes, nous avons utilisé un modèle murin du cancer du sein : la souris transgénique MMTV/*neu*. L'apport d'informations bi-directionnelles provenant des tumeurs humaines et des modèles murins va ultimement conduire à la découverte de tous les gènes suppresseurs de tumeurs. Ce savoir servira au diagnostic, à la prévention et au traitement des cancers (Osborne *et al.*, 2004). La réintroduction de gènes suppresseurs de tumeurs dans les cellules cancéreuses, permet d'inhiber la malignité.

Selon notre hypothèse de départ, d'autres événements génétiques coopèrent avec l'oncogène *neu/erbB2* dans le développement des tumeurs mammaires. Nous pensons aujourd'hui que la mutation du gène candidat EphA10 pourrait être l'un de ces événements. Le gène candidat EphA10 a été découvert grâce à la méthode LOH. Dans le passé, cette méthode a mené à la découverte des gènes GST les plus importants. L'analyse LOH systématique effectuée par notre laboratoire semble peu répandue dans la littérature. En effet, plusieurs groupes identifient des régions LOH (souvent larges) et les abandonnent par la suite. Nous aimerions démontrer par ce travail, qu'il faut plutôt accroître sans relâche le nombre de marqueurs analysés à l'intérieur des régions délétées pour finalement isoler les gènes d'intérêt. Aujourd'hui, la cartographie physique des séquences répétées polymorphiques augmente considérablement la précision des méthodes LOH. Nous avons

cartographié 36 loci LOH le long des chromosomes 4 et 19. Ces loci contiennent probablement plusieurs gènes supresseurs de tumeurs encore inconnus.

En plus de donner un aperçu des changements génétiques au sein d'une tumeur, la méthode LOH stimule les recherches concernant la recombinaison de l'ADN. Le chromosome 4 des tumeurs MMTV/*neu* semble démontrer un niveau de recombinaison élevé. Dans les tumeurs MMTV/*neu*, l'augmentation de la recombinaison semble accroître l'instabilité génétique et semble correspondre à un phénotype mutateur. Le gène suppresseur candidat EphA10 est la cible de recombinaisons dans les tumeurs MMTV/*neu*. Ces recombinaisons provoquent la mutation des séquences de l'intron 8 du gène EphA10. La découverte de mutations au sein d'une séquence codante située à l'intérieur d'une région LOH, représente une preuve solide dans l'identification d'un nouveau gène suppresseur de tumeurs.

Nous sommes heureux de présenter dans cette thèse un nouveau gène suppresseur candidat. Par ce travail, j'apporte mon humble contribution à ce vaste problème que représente le cancer. Je suis conscient que cette thèse comporte quelques maladroites reflétant mon inexpérience de jeune chercheur. Malgré tout, ces années d'études doctorales m'ont permis de mieux comprendre la puissance du raisonnement scientifique.

RÉFÉRENCES

Aasheim HC, Patzke S, Hjorthaug HS, Finne EF. (2005). Characterization of a novel Eph receptor tyrosine kinase, EphA10, expressed in testis. *Biochimica Biophysica Acta* **1723**:1-7.

Ahmadian M, Wistuba II, Fong KM, Behrens C, Kodagoda DR, Saboorian MH, Shay J, Tomlinson GE, Blum J, Minna JD, Gazdar AF. (1997). Analysis of the FHIT gene and FRA3B region in sporadic breast cancer, preneoplastic lesions, and familial breast cancer probands. *Cancer Research* **57**:3664-3668.

Aldaz CM, Liao QY, Paladugu A, Rehm S, Wang H. (1996). Allelotypic and cytogenetic characterization of chemically induced mouse mammary tumors: high frequency of chromosome 4 loss of heterozygosity at advanced stages of progression. *Molecular Carcinogenesis* **17**:126-133.

Al-Kuraya K, Schraml P, Torhorst J, Tapia C, Zaharieva B, Novotny H, Spichtin H, Maurer R, Mirlacher M, Kochli O, Zuber M, Dieterich H, Mross F, Wilber K, Simon R, Sauter G. (2004). Prognostic relevance of gene amplifications and coamplifications in breast cancer. *Cancer Research* **64**:8534-40.

Ali IU, Campbell G, Lidereau R, Callahan R. (1988) Lack of evidence for the prognostic significance of c-erbB-2 amplification in human breast carcinoma. *Oncogene Research* **3**:139-146.

Andersen TI, Gaustad A, Ottestad L, Farrants GW, Nesland JM, Tveit KM, Borresen AL. (1992). Genetic alterations of the tumour suppressor gene regions 3p, 11p, 13q, 17p, and 17q in human breast carcinomas. *Genes, Chromosomes and Cancer* **4**:113-121.

Anderson DE. (1974). Genetic study of breast cancer: identification of a high risk group. *Cancer* **34**:1090-1097.

Anderson DE. (1976). Genetic predisposition to breast cancer. *Recent Results Cancer Research* **57**:10-20.

Andreas AC, Reid H, Zuercher G, Blaschke RJ, Albrecht D, Ziemiecki A. (1994). Expression of two novel eph-related receptor protein tyrosine kinases in mammary gland development and carcinogenesis. *Oncogene* **9**:1461-1467.

Andrechek ER, Hardy WR, Siegel PM, Rudnicki MA, Cardiff RD, Muller WJ. (2000). Amplification of the neu/erbB-2 oncogene in a mouse model of mammary tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**:3444-3449.

Andres AC, Ziemiecki A. (2003). Eph and ephrin signaling in mammary gland morphogenesis and cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* **8**:475-485.

Anglian Breast Cancer Study Group. (2000). Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of breast cancer cases. *British Journal of Cancer* **83**:1301-1308.

Armitage P, Doll R. (1954). The age distribution of cancer and a multi-stage theory of carcinogenesis. *British Journal of Cancer* **8**:1-12.

Atkin NB. (1986). Chromosome 1 aberrations in cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics* **21**:279-285.

Baker RK, Antin PB. (2003). Ephs and ephrins during early stages of chick embryogenesis. *Developmental Dynamics* **228**:128-42.

Balmain A. (2001). Cancer genetics: from Boveri and Mendel to microarrays. *Nature Review Cancer* **1**:77-82.

Balmain A. (2002a). New-age tumour suppressors. *Nature* **417**:235-237.

Balmain A. (2002b). Cancer as a Complex Genetic Trait : Tumor Susceptibility in Humans and Mouse Models. *Cell* **108**:145-152.

Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA. (1986). Multiple independent activations of the neu oncogene by a point mutation altering the transmembrane domain of p185. *Cell* **45**:649-657.

Bargmann CI, Weinberg RA. (1988). Increased tyrosine kinase activity associated with the protein encoded by the activated neu oncogene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**:5394-5398.

Benavides F, Conti C, LaCava M, Flores M, Glasscock E, Sternik G, Gimenez-Conti I, Johnston D, Dunsford H, Goldstein L, Rodriguez L. (2003). Loss of heterozygosity analysis of mouse pulmonary adenomas induced by coal tar. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **41**: 300-308.

Bennett BD, Wang Z, Kuang WJ, Wang A, Groopman JE, Goeddel DV, Scadden DT. (1994). Cloning and characterization of HTK, a novel transmembrane tyrosine kinase of the EPH subfamily. *Journal of Biological Chemistry* **269**:14211-14218.

Berclaz G, Andres AC, Albrecht D, Dreher E, Ziemiecki A, Gusterson BA, Crompton MR. (1996). Expression of the receptor protein tyrosine kinase myk-1/htk in normal and malignant mammary epithelium. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **226**:869-875.

Berclaz G, Flutsch B, Altermatt HJ, Rohrbach V, Djonov V, Ziemiecki A, Dreher E, Andres AC. (2002). Loss of EphB4 receptor tyrosine kinase protein expression during carcinogenesis of the human breast. *Oncology Reports* **9**:985-989.

Berenblum I. (1941). The cocarcinogenic action of croton resin. *Cancer Research* **1**: 44-48.

Berenblum I, Shubik P. (1947). A new, quantitative, approach to the study of the stages of chemical carcinogenesis. *British Journal of Cancer* **1**:383-391.

Berg DT, Walls JD, Reifel-Miller AE, Grinnell BW. (1989). E1A-Induced enhancer activity of the poly(dG-dT) – Poly(dA-dC) element (GT element) and interactions with a GT-specific nuclear factor. *Molecular and Cellular Biology* **9**: 5248-5253.

Berx G, Cleton-Jansen AM, Nollet F, de Leeuw WJ, van de Vijver M, Cornelisse C. (1995). E-Cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers. *EMBO Journal* **14**:6107-6115.

Berx G, Cleton-Jansen AM, Strumane K, de Leeuw WJ, Nollet F, van Roy F, Cornelisse C. (1996). E-cadherin is inactivated in a majority of invasive human lobular breast cancers by truncation mutations throughout its extracellular domain. *Oncogene* **13**: 1919-1925.

Bièche I, Champeme M-H, Matifas F, Crop CS, Callahan R, Lidereau R. (1993). Two distinct regions involved in 1p deletion in human primary breast cancer. *Cancer Research* **53**:1900-1994.

Bièche I, Champeme M-H, Matifas F, Callahan R, Lidereau R. (1994). Mise en évidence de deux régions délétées sur le bras court du chromosome 1 dans les tumeurs du sein. *Bulletin du Cancer* **81**:108-113.

Bièche I, Lidereau, R. (1995). Genetic alterations in breast cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer*. **14**: 227-251.

Binns KL, Taylor PP, Sicheri F, Pawson T, Holland S. (2000). Phosphorylation of tyrosines residues in the kinase domain and juxtamembrane region regulates the biological and catalytic activities of Eph receptors. *Molecular and Cellular Biology* **20**:4791-4805.

Bittner JJ. (1936). Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice. *Science* **84**: 162.

Bittner JJ. (1943). Possible relationship of the oestrogenic hormones, genetic susceptibility and milk influence in the production of mammary cancer in mice. *Cancer Research* **2**:710-721.

Bishop AJ, Schiestl RH. (2003). Role of homologous recombination in carcinogenesis. *Experimental and Molecular Pathology* **74**:94-105.

Blackburn AC, McLary SC, Naeem R, Luszcz J, Stockton DW, Donehower LA, Mohammed M, Mailhes JB, Soferr T, Naber SP, Otis CN, Jerry DJ. (2004). Loss of heterozygosity occurs via mitotic recombination in Trp53^{+/-} mice associates with mammary tumor susceptibility of the BALB/c strain. *Cancer Research* **64**:5140-5147.

Bloodgood JC. (1934). Comedo-carcinoma (or comedo-adenoma) of the female breast. *American Journal of Cancer* **22**:842-853.

Borg A, Baldetorp B, Ferno M, Killander D, Olsson H, Sigurdsson H. (1991). ErbB2 amplification in breast cancer with a high rate of proliferation. *Oncogene* **6**:137-143.

Bouchard L, Lamarre L, Tremblay PJ, et Jolicoeur P. (1989). Stochastic appearance of mammary tumors in transgenic mice carrying the MMTV/c-neu oncogene. *Cell* **57**: 931-936.

Boveri T (1929) The origin of malignant tumors. Williams and Wilkins, Baltimore; Baillière, Tindall & Cox, London.

Buchkovich K, Duffy LA, Harlow E. (1989). The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell* **58**:1097-1105.

Bullock P, Miller J, Botchan M. (1986). Effects of poly[d(pGpT).d(pApC)] and poly[d(pCpG).d(pCpG)] repeats on homologous recombination in somatic cells. *Molecular & Cellular Biology* **6**: 3948-3953.

Broca P. (1866). *Traité des tumeurs*. **1**:80.

Broders AC. (1932). Carcinoma in situ contrasted with benign penetrating epithelium. *Journal of the American Medical Association* **99**:1670-1674.

Bruckner K, Pasquale EB, Klein R. (1997). Tyrosine phosphorylation of transmembrane ligands for Eph receptors. *Science* **275**:1640-1643.

Bryant HE, Brasher PMA. (1994). Risks and probabilities of breast cancer: short term versus lifetime probabilities. *Canadian Medical Association Journal* **150**:211-216.

Callahan R. (1996). MMTV-induced mutations in mouse mammary tumors: their potential relevance to human breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* **39**:33-34.

Callahan R, Smith G. (2000). MMTV-induced mammary tumorigenesis: gene discovery, progression to malignancy and cellular pathways. *Oncogene* **19**:992-1001.

Campbell MJ, Wollish WS, Lobo M, Esserman LJ. (2002). Epithelial and fibroblast cell lines derived from a spontaneous mammary carcinoma in a MMTV/*neu* transgenic mouse. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal* **38**:326-333.

Cavenee WK, Dryja TP, Phillips RA, Benedict WF, Godbout R, Gallie BL, Murphree AL, Strong LC, White RL. (1983). Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* **305**:779-784.

Chen PL, Scully P, Shew JY, Wang JY, Lee WH. (1989). Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. *Cell* **58**:1193-1198.

Ciossek T, Millauer B, Ullrich A. (1995). Identification of alternatively spliced mRNAs encoding variants of MDK1, a novel receptor tyrosine kinase expressed in the murine nervous system. *Oncogene* **10**:97-108.

Clancy M, Hannah LC. (2002). Splicing of the maize Sh1 first intron is essential for enhancement of gene expression, and a T-rich motif increases expression without affecting splicing. *Plant Physiology* **130**: 918-929.

Clarke AR, Maandag ER, Roon MV, Van Lught NMT, van der Valk M, Hooper ML, Berns A, Riele H. (1992). Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development. *Nature* **359**:328-330.

Cleary HJ, Wright E, Plumb M. (1999). Specificity of loss of heterozygosity in radiation-induced mouse myeloid and lymphoid leukaemias. *International Journal of Radiation Biology* **75**:1223-1230.

Coleman WB, Tsongalis GJ. (1999). The role of genomic instability in human carcinogenesis. *Anticancer Research* **19**:4645-4664.

Comings DE. (1973). A general theory of carcinogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **70**:3324-3328.

Cool M, Jolicoeur P. (1999). Elevated frequency of loss of heterozygosity in mammary tumors arising in mouse mammary tumor virus/neu transgenic mice. Cancer Research **10**:2438-44.

Coulthard MG, Duffy S, Down M, Evans B, Power M, Smith F, Stylianou C, Kleikamp S, Oates A, Lackmann M, Burns GF, Boyd AW. (2002). The role of the Eph-ephrin signalling system in the regulation of developmental patterning. International Journal of Developmental Biology **46**:375-84.

Cornelis RS, Van Vliet M, Vos CBJ, Cleton-Jasen AM, van de Vijver M, Peterse JL, Khan PM, Borresen AL, Cornelisse CJ, Devilee P. (1994). Evidence for a gene on 17p13.3, distal to TP53, as a target for allele loss in breast tumors without p53 mutations. Cancer Research **54**: 4200-4206.

Cotton RG, Rodrigues NR, Campbell RD. (1988). Reactivity of cytosine and thymine in single-base-pair mismatch with hydroxylamine and osmium tetra oxide and its application to the study of mutations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **85**:4397-4401.

Cowan CA, Henkemeyer M. (2002). Ephrins in reverse, park and drive. Trends in Cell Biology **12**: 339-346.

Dankort DL, Muller WJ. (2000). Signal transduction in mammary tumorigenesis: a transgenic perspective. Oncogene **19**: 1038-1044.

Davy A, Gale NW, Murray EW, Klinghoffer RA, Soriano P, Feuerstein C, Robbins SM. (1999). Compartmentalized signaling by GPI-anchored ephrin-A5 requires the Fyn tyrosine kinase to regulate cellular adhesion. Genes & Development **13**:3125-3135.

Davy A, Soriano P. (2005). Ephrin signaling in vivo: look both ways. Developmental dynamics **232**: 1-10.

DeCaprio JA, Ludlow JW, Lynch D, Furukawa Y, Griffin J, Piwnica-Worms H, Huang CM, Livingston DM. (1989). The product of the retinoblastoma susceptibility gene has properties of a cell cycle regulatory element. Cell **58**:1085-1095.

DeLeo AB, Jay G, Appella E, Dubois GC, Law LW, Old, LJ. (1979). Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **76**:2420-2424.

Devilee P, Clenton-Jansen AM, Cornelisse CJ. (2001). Ever since Knudson. *TRENDS in Genetics* **17**:569-573.

Dietrich WF, Miller JC, Steen RG, Merchant M, Damron D, Nahf R, Gross A, Joyce DC, Wessel M, Dredge RD, *et al.* (1994). A genetic map of the mouse with 4,006 simple sequence length polymorphisms. *Nature Genetics* **7**:220-245.

Dodelet VC, Pasquale EB. (2000). Eph receptors and ephrin ligands: embryogenesis to tumorigenesis. *Oncogene* **19**:5614 -5619.

Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA Jr, Butel JS, Bradley A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* **356**:215-221.

Duelli D, Lazebnik Y. (2003). Cell fusion: a hidden enemy? *Cancer cell* **3**:445-8.

Dunn JM, Phillips RA, Becker AJ, Gallie BL. (1988). Identification of germline and somatic mutations affecting the retinoblastoma gene. *Science* **241**:1797-1800.

Dutreix M. (1997). (GT)_n repetitive tracts affect several stages of RecA-promoted recombination. *Journal of Molecular Biology* **273**:105-113.

Dutrillaux B, Couturier J. Technique de laboratoire numéro 12. La pratique de l'analyse chromosomique. Masson, Paris, 1981.

Ellisen LW, Haber DA. (1998). Hereditary breast cancer. *Annual Review in Medicine* **49**:425-436.

Ernster VL, Barclay J, Kerlikowske K, Grady D, Henderson C. (1996). Incidence of and treatment for ductal carcinoma in situ of the breast. *The Journal of the American Medical Association* **275**: 913-918.

Ejima Y, Yang L, Sasaki MS. (2000). Aberrant splicing of the ATM gene associated with shortening of the intronic mononucleotide tract in human colon tumor cell lines : a novel mutation target of microsatellite instability. *International Journal of Cancer* **86**: 262-268.

Fletcher SW, Black W, Harris R, Rimer BK, Shapiro S. (1993). Report of the International Workshop on Screening for Breast Cancer. *Journal of National Cancer Institute* **85**:1644-1656.

Fialkow PJ. (1974). The origin and development of human tumors studied with cell markers. *The New England Journal of Medicine* **291**:26-35.

Fischer SG, Lerman LS. (1983). DNA fragment differing by single base substitution are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80**:1579-1583.

Fox BP, Kandpal RP. (2004). Invasiveness of breast carcinoma cells and transcript profile: Eph receptors and ephrin ligands as molecular markers of potential diagnostic and prognostic application. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **318**:882-892.

- Francke U, Kung F.** (1976). Sporadic bilateral retinoblastoma and 13q- chromosomal deletion. *Medical Pediatric Oncology* **2**:379-385.
- Frayling IM.** (2002). Methods of molecular analysis: mutation detection in solid tumours. *Journal of Clinical and Molecular Pathology* **55**:73-79.
- Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, Dryja TP.** (1986). A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* **323**:643-646.
- Gallie BL, Phillips RA.** (1982). Multiple manifestations of the retinoblastoma gene. *Birth Defects Orig. Art. Ser.* **18**: 689-701.
- Ganguly A, Rock MJ, Prockop DJ.** (1993). Conformation sensitive gel electrophoresis for rapid detection of single base differences in double-stranded PCR products and DNA fragments. Evidence for solvent induced bends in DNA hetreoduplexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**:10325-10329.
- Garcia-Patino E, Gomendio B, Provencio M, Silva JM, Garcia JM, Espana P, Bonilla F.** (1998). Germ-line BRCA1 mutations in women with sporadic breast cancer: clinical correlations. *Journal of Clinical Oncology* **14**:115-120.
- Gendrel CG, Boulet A, Dutreix M.** (2000). (CA/GT)(n) microsatellites affect homologous recombination during yeast meiosis. *Genes Development* **14**:1261-1268.
- Ghebranious N, Donehower LA.** (1998). Mouse models in tumor suppression. *Oncogene* **17**: 3385-3400.
- Gray JW, Collins C.** (2000). Genome changes and gene expression in human solid tumors. *Carcinogenesis* **21**:443-452.
- Greller LD, Tobin FL, Poste G.** (1996). Tumor heterogeneity and progression: conceptual foundations for modeling. *Invasion Metastasis* **16**: 177-208.
- Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC.** (1994). Mutations in the p53 tumor suppressor gene: Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Research* **54**: 4855-4878.
- Gupta PK, Sahota A, Boyadjiev SA, Bye S, Shao C, O'Neill JP, Hunter TC, Albertini RJ, Stambrook PJ, Tischfield JA.** (1997). High frequency in vivo loss of heterozygosity is primarily a consequence of mitotic recombination. *Cancer Research* **57**: 1188-1193.
- Guy CT, Webster MA, Schaller M, Parsons TJ, Cardiff RD, Muller WJ.** (1992). Expression of the *neu* protooncogene in the mammary epithelium of transgenic mice induces metastatic disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**:10578-10582.
- Gyapay G, Morissette J, Vignal A, Dib C, Fizames C, Millasseau P, Marc S, Bernardi G, Lathrop M, Weissenbach J.** (1994). The 1993-94 Genethon human genetic linkage map. *Nature Genetics* **7**:246-339.

Hafner C, Bataille F, Meyer S, Becker B, Roesch A, Landthaler M, Vogt T. (2003). Loss of EphB6 expression in metastatic melanoma. *International Journal of Oncology* **23**:1553-1559.

Hagstrom SA, Dryja TP. (1999). Mitotic recombination map of 13cen-13q14 derived from an investigation of loss of heterozygosity in retinoblastomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**:2952-2957.

Hakem R, de la Pompa JL, Sirard C, Mo R, Woo M, Hakem A, Wakeham A, Potter J, Reitmair A, Billia F, Firpo E, Hui CC, Roberts J, Rossant J, Mak TW. (1996). The tumor suppressor gene *Brcal* is required for embryonic cellular proliferation in the mouse. *Cell* **85**:1009-1023.

Hamada H, Seidman M, Howard B.H, Gorman C. (1984). Enhanced gene expression by the poly(dT-dG) – poly(dC-dA) sequence. *Molecular and Cellular Biology* **4**: 2622-2630.

Hamilton BA, Frankel WN. (2001). Of mice and genome sequence. *Cell* **107**:13-16.

Hanahan D, Weinberg R. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**:57-70.

Hankins GR, De Souza AT, Bentley RC, Patel MR, Marks JR, Iglehart JD, Jirtle RL. (1996). M6P/IGF2 receptor: a candidate breast tumor suppressor gene. *Oncogene* **12**: 2003-2009.

Harris H, Miller OJ, Klein G, Worst P, Tachibana, T. (1969). Supression of malignancy by cell fusion. *Nature* **223**:363-368.

Harris H, Wiener F, Klein G. (1971). The analysis of malignancy by cell fusion. 3. Hybrids between diploid fibroblasts and other tumour cells. *Journal of Cell Science* **8**:681-92.

Hartmann A, Blaszyk H, Kovach JS, Sommer, SS. (1997). The molecular epidemiology of p53 gene mutations in human breast cancer. *Trends in Genetics* **13**:27-33.

Hartmann LC, Schaid DJ, Woods JE, Crotty TP, Myers JL, Arnold PG, Petty PM, Sellers TA, Johnson JL, McDonnell SK, Frost MH, Jenkins RB. (1999). Efficacy of bilateral prophylactic mastectomy in women with a family history of breast cancer. *The New England Journal of Medecine* **340**:77-84.

Hayashi S, Tanimoto K, Hajironakanishi K, Tsuchiya E, Kurosumi M, Higashi Y, Imai K, Suga K, Nakachi K. (1997). Abnormal FHIT transcripts in human breast carcinomas, a clinicopathological and epidemiological analysis of 61 Japanese cases. *Cancer Research* **57**:1981-1985.

Helleday T. (2003). Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells. *Mutation Research* **532**:103-115.

Helin K, Lees JA, Vidal M, Dyson N, Harlow E, Fattaey A. (1992). A cDNA encoding a pRB-binding protein with properties of the transcription factor E2F. *Cell* **70**: 337-350.

Heyer WD. (2004). Recombination: Holliday junction resolution and crossover formation. *Current Biology* **14**:R56-58.

Himanen JP, Chumley MJ, Lackmann M, Li C, Barton WA, Jeffrey PD, Vearing C, Geleick D, Feldheim DA, Boyd AW, Henkemeyer M, Nikolov DB. (2004). Repelling class discrimination: ephrin-A5 binds to and activates EphB2 receptor signaling. *Nature Neuroscience* **7**:501-509.

Himanen JP, Nikolov DB. (2003). Eph receptors and ephrins. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **35**:130-134.

Hirai H, Maru Y, Hagiwara K, Nishida J, Takaku F. (1987). A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the eph gene. *Science* **238**:1717-1720.

Holland SJ, Gale NW, Mbamalu G, Yancopoulos GD, Henkemeyer M, Pawson T. (1996). Bidirectional signalling through the EPH-family receptor Nuk and its transmembrane ligands. *Nature* **383**:722-725.

Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. (1991). P53 mutations in human cancers. *Science* **253**: 49-53.

Holmberg J, Clarke DL, Frisen J. (2000). Regulation of repulsion versus adhesion by different splice forms of an Eph receptor. *Nature* **408**:203-206.

Hovey RC, Trott JF. (2004). Morphogenesis of mammary gland development. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **554**:219-28.

Huang, HJS, Yee JK, Shew JY, Chen PL, Bookstein R, Friedmann T, Lee EY, Lee WH. (1988). Suppression of the neoplastic phenotype by replacement of the RB gene in human cancer cells. *Science* **242**:1563-1566.

Hu N, Gutschmann A, Herbert DC, Bradley A, Lee WH, Lee EY. (1994). Heterozygous Rb-1 delta 20/+mice are predisposed to tumors of the pituitary gland with a nearly complete penetrance. *Oncogene* **9**:1021-1027.

Hui J, Stangl K, Lane WS, Bindereif A. (2003a). HnRNP L stimulates splicing of the eNOS gene by binding to variable-length CA repeats. *Nature Structural Biology* **10**:33-37.

Hui J, Reither G, Bindereif A. (2003b). Novel functional role of CA repeats and hnRNP L in RNA stability. *RNA* **9**: 931-936.

Institut national du cancer du Canada. (1999). *Statistiques canadiennes sur le cancer*, 1999. Toronto, Canada.

Institut national du cancer du Canada. (2004). *Statistiques canadiennes sur le cancer*, 2004. Toronto, Canada. ISSN 0835-2976.

Ingvarsson S. (1999). Molecular genetics of breast cancer progression. *Cancer Biology*. **9**: 277-288.

Jacks T. (1996). Tumor suppressor gene mutations in mice. *Annual Review in Genetic* **30**:603-36.

Jacks T, Fazeli A, Schmitt EM, Bronson RT, Goodell MA, Weinberg RA. (1992). Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature* **359**:295-300.

Jedinak A, Maliar T. (2005). Inhibitors of proteases as anticancer drugs. *Neoplasma* **52**:185-92.

Jolicoeur P, Bouchard L, Guimond A, Ste-Marie M, Hanna Z, Dievert A. (1998). Use of mouse mammary tumour virus (MMTV)/neu transgenic mice to identify genes collaborating with the c-erbB-2 oncogene in mammary tumour development. *Biochemical Society Symposia* **63**:159-165.

Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. (1992a). Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* **258**:818-821.

Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Waldman FM, Chen LC, Yu LC, Fung YK, Smith HS, Pinkel D, Gray JW. (1992b). Detection of retinoblastoma gene copy number in metaphase chromosomes and interphase nuclei by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenetics and Cell Genetics* **60**:190-193.

Kashiwaba M, Tamura G, Ishida M. (1994). Aberrations of the APC gene in primary breast carcinoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* **120**: 727-731.

Kataoka, H., Igarashi, H., Kanamori, M., Ihara, M., Wang, J. D., Wang, Y. J., Li, Z. Y., Shimamura, T., Kobayashi, T., Maruyama, K., Nakamura, T., Arai, H., Kajimura, M., Hanai, H., Tanaka, M., and Sugimura, H. (2004). Correlation of EPHA2 overexpression with high microvessel count in human primary colorectal cancer. *Cancer Sciences* **95**: 136-141.

Kelsey JL, Bernstein L. (1996). Epidemiology and prevention of breast cancer. *Annual Review Public Health* **17**:47-67.

Kinch, M. S., Moore, M. B., and Harpole, D. H., Jr. (2003). Predictive value of the EphA2 receptor tyrosine kinase in lung cancer recurrence and survival. *Clinical Cancer Research* **9**: 613-618.

Kinzler KW, Vogelstein B. (1997). Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* **386**:761-763.

Kuhn R, Schwenk F, Aguet M, Rajewsky, K. (1995). Inducible gene targeting in mice. *Science* **269**: 1427-1429.

Knudson AG. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **68**:820-823.

Knudson AG. (1973). Mutation and human cancer. *Advances in Cancer Research* **17**: 317-352.

Knudson AG. (1978). Retinoblastoma: a prototypic hereditary neoplasm. *Seminars in Oncology* **5**:57-60.

Knudson A, Vande Woude GF, Friend SH, Cavenee WK, Brodeur GM. (1991). Developmental genetics and childhood cancer. AACR special conference in cancer research. *Cancer Research* **51**: 5435-5439.

- Knudson AG.** (1993). Antioncogenes and human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United* **90**:10914-10921.
- Knudson, AG.** (2001). Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nature Reviews* **1**: 157-162.
- Knudson AG.** (2002). Fox Chase Cancer Center Scientific Report.
- Kullander K, Klein R.** (2002). Mechanisms and functions of EPH and Ephrins signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **3**:475-86.
- Lancaster JM, Wooster R, Mangion J, Phelan, Cochran C, Gumbs C, Seal S, Barfoot R, Collins N, Bignell G, Patel S, Hamoudi R, Larsson C, Wiseman RW, Berchuck A, Iglehart JD, Marks JR, Ashworth A, Stratton MR, Futreal PA.** (1996). BRCA2 mutations in primary breast and ovarian cancers. *Nature Genetics* **13**: 238-240.
- Lawrenson ID, Wimmer-Kleikamp SH, Lock P, Schoenwaelder SM, Down M, Boyd AW, Alewood PF, Lackmann M.** (2002). Ephrin-A5 induces rounding, blebbing and de-adhesion of EphA3-expressing 293T and melanoma cells by CrkII and Rho-mediated signalling. *Journal of Cell Science* **115**:1059-1072.
- Lee EY, To H, Shew JY, Bookstein R, Scully P, Lee WH.** (1988). Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in human breast cancers. *Science* **241**: 218-221.
- Lee EYHP, Chang CY, Hu N, Wang YCJ, Lai CC, Herrup K, Lee WH, Bradley A.** (1992). Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. *Nature* **359**:288-294.
- Lee GH, Ogawa K, Nishimori H, Drinkwater NR.** (1995). Most liver epithelial cell lines from C3B6F1 mice exhibit parentally-biased loss of heterozygosity at the Lci (Liver cell immortalization) locus on chromosome 4. *Oncogene* **11**:2281-2287.
- Leonard JH, Cook AL, Nancarrow D, Hayward N, Van Gele M, Van Roy N, Speleman F.** (2000). Deletion mapping on the short arm of chromosome 1 in Merkel cell carcinoma. *Cancer Detection and Prevention* **24**:620-627.
- Levine AJ.** (1993). The tumor suppressor genes. *Annual Review of Biochemistry* **62**:623-651.
- Levinson G, Gutman GA.** (1987). Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution* **4**:203-221.
- Li FP, Fraumeni JF Jr.** (1969). Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome. *Annals of Internal Medicine* **71**:747-752.
- Liu CY, Flesken-Nikitin A, Li S, Zeng Y, Lee WH.** (1996). Inactivation of the mouse Brcal gene leads to failure in the morphogenesis of the egg cylinder in early postimplantation development. *Genes and Development* **10**:1835-1843.
- Liu P, Jenkins NA, Copeland NG.** (2003). A highly efficient recombineering-based method for generating conditional knockout mutations. *Genome Research* **13**:476-484.
- Lloyd KM, Dennis M.** (1963). Cowden's disease: a possible new symptom complex with multiple system involvement. *Annals of Internal Medicine* **58**: 136-142.

Loeb LA, Loeb KR, Anderson JP. (2003). Multiple mutations and cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**:776-781.

Ludwig T, Chapman DL, Papaioannou VE, Efstratiadis A. (1997). Targeted mutations of breast cancer susceptibility gene homologs in mice: lethal phenotypes of *Brca1*, *Brca2*, *Brca1/Brca2*, *Brca1/p53*, and *Brca2/p53* nullizygous embryos. *Genes and Development* **11**:1226-1241.

Lynch ED, Ostermeyer EA, Lee MK, Arena JF, Ji HL, Dann J, Swisshelm K, Suchard D, Macleod PM, Kvinnsland S, Gjertsen BT, Heimdal K, Lubs H, Moller P, King MC. (1997). Inherited mutations in *PTEN* that are associated with breast cancer, Cowden-disease, and juvenile polyposis. *The American Journal of Human Genetics* **61**:1254-1260.

Macleod K. (2000). Tumor suppressor gene. *Current Opinion in Genetics & Development* **10**:81-93

Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF, Nelson CE, KIM DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA et al. (1990). Germ line *p53* mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* **250**:1233-1238.

Marston DJ, Dickinson S, Nobes CD. (2003). Rac-dependent trans-endocytosis of ephrinBs regulates Eph-ephrin contact repulsion. *Nature Cell Biology* **5**:879-888.

Maru Y, Hirai H, Takaku F. (1990). Overexpression confers an oncogenic potential upon the *eph* gene. *Oncogene* **5**:445-447.

McKee BD. (2004). Homologous pairing and chromosome dynamics in meiosis and mitosis. *Biochimica and Biophysica Acta* **1677**:165-80.

Medeiros AC, Nagai Ma, Neto MM, Brentani RR. (1994). Loss of heterozygosity affecting the *APC* and *MCC* genetic loci in patients with primary breast carcinomas. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* **3**: 331-333.

Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W, et al. (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene *BRCA1*. *Science* **266**:66-71.

Miki Y, Katagiri T, Kasumi F, Yoshimoto T, Nakamura Y. (1996). Mutation analysis in the *BRCA2* gene in primary breast cancers. *Nature Genetics* **13**: 245-247.

Miyazaki, T., Kato, H., Fukuchi, M., Nakajima, M., and Kuwano, H. (2003). *EphA2* overexpression correlates with poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *International Journal of Cancer* **103**: 657-663.

Mizuta R, LaSalle JM, Cheng HL, Shinohara A, Ogawa H, Copeland N, Jenkins NA, Lalande M, Alt FW. (1997). *RAB22* and *RAB163*/mouse *BRCA2*: proteins that specifically interact with the *RAD51* protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**:6927-6932.

Montagna C, Andrechek ER, Padilla-Nash H, Muller WJ, Ried T. (2002). Centrosome abnormalities, recurring deletions of chromosome 4, and genomic amplification of *HER2/neu* define mouse mammary gland adenocarcinomas induced by mutant *HER2/neu*. *Oncogene* **21**:890-898.

- Moolgavkar SH, Luebeck EG.** (2003). Multistage Carcinogenesis and the incidence of human cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer* **38**: 302-306.
- Muller HJ.** (1927). Artificial transmutation of the gene. *Science* **46**: 84-87.
- Muller WJ, Sinn E, Pattengale PK, Wallace R, Leder P.** (1988). Single-step induction of mammary adenocarcinoma in transgenic mice bearing the activated c-neu oncogene. *Cell* **54**:105-115.
- Munarini N, Jager R, Abderhalden S, Zuercher G, Rohrbach V, Loercher S, Pfanner-Meyer B, Andres AC, Ziemiecki A.** (2002). Altered mammary epithelial development, pattern formation and involution in transgenic mice expressing the EphB4 receptor tyrosine kinase. *Journal of Cell Science* **115**:25-37.
- Murai K, Pasquale EB.** (2003). Eph' ective signaling: forward, reverse and crosstalk. *Journal of Cell Science* **116**: 2823-2832.
- Murai K, Pasquale EB.** (2004). Eph receptors, Ephrins and synaptic function. *Neuroscientist* **10**: 304-314.
- Murphy KE, Stringer JR.** (1986). RecA independent recombination of poly[d(GT)-d(CA)] in pBR322. *Nucleic Acids Research* **14**:7325-7340.
- Nachman MW, Crowell SL.** (2000). Estimate of the mutation rate per nucleotide in humans. *Genetics* **156**:297-304.
- Nakada M, Niska JA, Miyamori H, McDonough WS, Wu J, Sato H, Berens ME.** (2004). The phosphorylation of EphB2 receptor regulates migration and invasion of human glioma cells. *Cancer Research* **64**:3179-85.
- Nakamoto M, Bergemann AD.** (2002). Diverse roles for the Eph family of receptor tyrosine kinases in carcinogenesis. *Microscopy Research and Techniques* **59**:58-67.
- Naylor L, Clark E.** (1990). d(TG)_n – d(CA)_n sequences upstream of the rat prolactin gene form Z-DNA and inhibit gene transcription. *Nucleic Acids Research* **18**: 1595- 1601.
- Negrini M, Monaco C, Vorechovsky I, Ohta M, Druck T, Baffa R, Huebner K, Croce CM.** (1996). The FHIT gene at 3p14.2 is abnormal in breast carcinomas. *Cancer Research* **56**:3173-3179.
- Nikolova, Z, Djonov V, Zuercher G, Andreas A.C, Ziemiecki A.** (1998). Cell-type specific and estrogen dependent expression of the receptor tyrosine kinase EphB4 and its ligand ephrin-B2 during mammary gland morphogenesis. *Journal of Cell Science* **111**:2741-2751.
- Niksic M, Romano M, Buratti E, Pagani F, Baralle F.** (1999). Functional analysis of cis-acting elements regulating the alternative splicing of human CFTR exon 9. *Human molecular Genetics* **8**:2339-2349.
- Nishizaki T, Chew K, Chu L, Isola J, Kallioniemi A, Weider N, Waldman FM.** (1997). Genetic alterations in lobular breast cancer by comparative genomic hybridization. *International Journal of Cancer* **74**:513-517.

- Nordheim A, Rich A.** (1983). Negatively supercoiled simian virus 40 DNA contains Z-DNA segments within transcriptional enhancer sequences. *Nature* **303**:674-679.
- Nordling C.** (1953). A new theory on cancer-inducing mechanism. *British Journal of Cancer* **7**:68-72.
- Noren NK, Lu M, Freeman AL, Koolpe M, Pasquale EB.** (2004). Interplay between EphB4 on tumor cells and vascular ephrin-B2 regulates tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**:5583-5588.
- Nowell PC.** (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* **194**:23-8.
- Oba SM, Wang Y, Song J, Li Z, Kobayashi K, Tsugane S, Hamada G.S, Tanaka M, Sugimura H.** (2001). Structure and loss of heterozygosity of EPHB2 in colorectal cancer. *Cancer Letter* **164**:97-104.
- Oesterreich S, Fuqua SAW.** (1999). Tumor suppressor genes in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* **6**:405-419.
- Okada Y.** (1962). Analysis of giant polynuclear cell formation caused by hvj virus from ehrlich's ascites tumor cells. i. microscopic observation of giant polynuclear cell formation. *Experimental Cell Research* **26**:98-107.
- Okumoto M, Park YG, Song CW, Mori N.** (1999). Frequent loss of heterozygosity on chromosomes 4, 12 and 19 in radiation-induced lymphomas in mice. *Cancer Letter* **135**:223-228.
- Olah E, Balogh E, Kovacs I, Kiss A.** (1989). Abnormalities of chromosome 1 in relation to human malignant diseases. *Cancer Genetics and Cytogenetics* **43**:179-194.
- Orye E, Delbeke MJ, Vandenabeele B.** (1971). Retinoblastoma and D-chromosome deletions. *Lancet* **2**:1376.
- Osborne RJ, Hamshire MG.** (2000). A genome-wide map showing common regions of loss of heterozygosity/allelic imbalance in breast cancer. *Cancer Research* **60**:3706-3712.
- Osborne C, Wilson P, Tripathy D.** Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *Oncologist* **4**:361-77.
- Ozbun MA, Butel JS.** (1995). Tumor supressor p53 mutations and breast cancer: a critical analysis. *Advances in cancer Research* **66**: 71-141.
- Padhy LC, Shih C, Cowing D, Finkelstein R, Weinberg RA.** (1982). Identification of a phosphoprotein specifically induced by the transforming DNA of rat neuroblastomas. *Cell* **28**:865-871.
- Pagani F, Buratti E, Stuni C, Romano M, Zuccato E, Niksic M, Giglio L, Faraguna D, Baralle F.** (2000). Splicing factors induce cystic fibrosis transmembrane regulator exon 9 skipping through a nonevolutionary conserved intronic element. *The Journal of Biological Chemistry* **275**: 21041-21047.
- Pendergrass TW, Davis S.** (1980). Incidence of retinoblastoma in the United States. *Archives of Ophthalmology* **98**:1204-1210.

Peto J, Collins N, Barfoot R, Seal S, Warren W, Rahman N, Easton DF, Evans C, Deacon J, Stratton MR. (1999). Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in patients with early-onset breast cancer. *Journal of National Cancer Institute* **91**: 943-949.

Ponder B. (2001). Cancer genetics. *Nature* **17**:336-341.

Popescu NC. (2003). Genetic alterations in cancer as a result of breakage at fragile sites. *Cancer Letters* **192**:1-17.

Radany EH, Hong K, Kesharvarzi S, Lander ES, Bishop JM. (1997). Mouse mammary tumor virus/v-Ha-ras transgene-induced mammary tumors exhibit strain-specific allelic loss on mouse chromosome 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**:8664-8669.

Ragnarsson G, Eiriksdottir G, Johannsdottir JT, Jonasson JG, Egilsson V, Ingvarsson S. (1999). Loss of heterozygosity at chromosome 1p in different solid human tumours: association with survival. *British Journal of Cancer* **79**:1468-1474.

Rhei E, Kang L, Bogomolny F, Federici MG, Borgen PI, Boyd J. (1997). Mutation analysis of the putative tumor suppressor gene PTEN/MMAC1 in primary breast carcinomas. *Cancer Research* **57**:3657-3659.

Rich A, Zhang S. (2003). Z-DNA: the long road to biological function. *Nature Reviews Genetics* **4**: 566-573.

Ritland SR, Rowse GJ, Chang Y, Gendler SJ. (1997). Loss of heterozygosity analysis in primary mammary tumors and lung metastases of MMTV-MTag and MMTV-*neu* transgenic mice. *Cancer Research* **57**:3520-3525.

Rothenburg S, Koch-Nolte F, Rich A, Haag F. (2001). A polymorphic dinucleotide repeat in the rat nucleolin gene forms Z-DNA and inhibits promoter activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**:8985-8990.

Rous P, Kidd JG. (1941). Conditional neoplasms and subthreshold neoplastic states. *Journal Experimental Medicine* **73**:365-389.

Sakorafas GH, Tsiotou AG. (2000). Ductal carcinoma in situ (DCIS) of the breast: evolving perspectives. *Cancer Treatment Review* **26**:103-125.

Santoro C, Costanzo F, Ciliberto G. (1984). Inhibition of eukaryotic tRNA transcription by potential Z-DNA sequences. *EMBO Journal* **3**:1553-1559.

Sargent RG, Merrihew RV, Nairn R, Adair G, Meuth M, Wilson JH. (1996). The influence of a (GT)₂₉ microsatellite sequence on homologous recombination in the hamster adenine phosphoribosyltransferase gene. *Nucleic Acids Research* **24**:746-753.

Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, Decker SJ, Drebin JA, Greene MI, Weinberg RA. (1984). The *neu* oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature* **312**:513-516.

Schwab M, Praml C, Amler LC. (1996). Genomic instability in 1p and human malignancies. *Genes, Chromosomes and Cancer* **16**:211-229.

Scully R, Chen J, Plug A, Xiao Y, Weaver D, Feunteun J, Ashley T, Livingston DM. (1997). Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* **88**:265-275.

Semba K, Kamata N, Toyoshima K, Yamamoto T. (1985). A v-erbB-related protooncogene, c-erbB-2, is distinct from the c-erbB-1/epidermal growth factor-receptor gene and is amplified in a human salivary gland adenocarcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **19**:6497-501.

Shao C, Deng L, Henegariu O, Liang L, Raikwar, Sahota A, Stambrook P, Tischfield J.A. (1999). Mitotic recombination produces the majority of recessive fibroblast variants in heterozygous mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**:9230-9235.

Sherr C. (2004). Principles of tumor suppression. *Cell* **116**:235-246.

Shih C, Padhy LC, Murray M, Weinberg RA. (1981). Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature* **290**:261-264.

Shimajiri S, Arima N, Tanimoto A, Murata Y, Hamada T, Wang K.Y, Sasaguri Y. (1999). Shortened microsatellite d(CA)21 sequence down-regulates promoter activity of matrix metalloproteinase 9 gene. *Federation of European Biochemical Societies Letters* **455**:70-74.

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WS, Ullrich A, McGuire WL. (1987). Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* **235**:177-182.

Smith GH. (1967). Cytochemical studies on the mouse mammary tumor virus. *Cancer Research* **27**:2179-2196.

Smith SM, Sorsby A. (1958). Retinoblastoma: some genetic aspects. *Annals of Human Genetics* **23**:50-58.

Smith G.P. (1973). Unequal crossover and the evolution of multigene families. *Cold Spring Harbor Laboratory Symp. Quantitative Biology* **31**: 507-513.

Suter B, Schnappauf G, Thoma F. (2000). Poly(dA-dT) sequences exist as rigid DNA structures in nucleosome-free yeast promoters *in vivo*. *Nucleic Acids Research* **28**:4083-4089.

Surawska H, Ma PC, Salgia R. (2004). The role of ephrins and Eph receptors in cancer. *Cytokine Growth Factor Review* **15**:419-33.

Stephens P, Edkins S, Davies H, Greenman C, Cox C, Hunter C, Bignell G, Teague J, Smith R, Stevens C, O'Meara S, Parker A, Tarpey P, Avis T, Barthorpe A, Brackenbury L, Buck G, Butler A, Clements J, Cole J, Dicks E, Edwards K, Forbes S, Gorton M, Gray K, Halliday K, Harrison R, Hills K, Hinton J, Jones D, Kosmidou V, Laman R, Lugg R, Menzies A, Perry J, Petty R, Raine K, Shepherd R, Small A, Solomon H, Stephens Y, Tofts C, Varian J, Webb A, West S, Widaa S, Yates A, Brasseur F, Cooper CS, Flanagan AM, Green A, Knowles M, Leung SY, Looijenga LH, Malkowicz B, Pierotti MA, Teh B, Yuen ST, Nicholson AG, Lakhani S, Easton

DF, Weber BL, Stratton MR, Futreal PA, Wooster R. (2005). A screen of the complete protein kinase gene family identifies diverse patterns of somatic mutations in human breast cancer. *Nature Genetics* **37**:590-592.

Steinle JJ, Meininger CJ, Chowdhury U, Wu G, Granger HJ. (2003). Role of ephrin B2 in human retinal endothelial cell proliferation and migration. *Cell Signaling* **15**:1011-7.

Steinle JJ, Meininger CJ, Forough R, Wu G, Wu MH, Granger HJ. (2002). Eph B4 receptor signaling mediates endothelial cell migration and proliferation via the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Journal of Biology and Chemistry* **277**:43830-5.

Streisinger G, Okeda Y, Emrich Y, Newton J, Tsugita A, Terzaghi E, Inouye M. (1996). Frameshift mutations and the genetic code. *Cold Spring Harbor Symp. Quantative Biology* **31**: 77-84.

Szostak JW, Orr-Weaver TL, Rothstein RJ, Stahl FW. (1983). The double-strand break repair model for recombination. *Cell* **33**:25-35.

Tang, X. X., Evans, A. E., Zhao, H., Cnaan, A., London, W., Cohn, S. L., Brodeur, G. M., and Ikegaki, N. (1999). High-level expression of EPHB6, EFNB2, and EFNB3 is associated with low tumor stage and high TrkA expression in human neuroblastomas. *Clinical Cancer Research* **5**: 1491-1496.

Tang, X. X., Zhao, H., Robinson, M. E., Cohen, B., Cnaan, A., London, W., Cohn, S. L., Cheung, N. K., Brodeur, G. M., Evans, A. E., and Ikegaki, N. (2000). Implications of EPHB6, EFNB2, and EFNB3 expressions in human neuroblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 10936-10941.

T' Ang A, Varley JM, Chakraborty S, Murphree AL, Fung YK. (1988). Structural rearrangement of the retinoblastoma gene in human breast carcinoma. *Science* **242**:263-266.

Tandon A, Clark G, Chamness GC, Ullrich A, McGuire W. (1989). HER-2/neu oncogene protein and prognostic in breast cancer. *Jouranl of Clinical Oncology* **7**:1120-1128.

Takahashi JS, Pinto LH, Vitaterna MH. (1994). Forward and reverse genetic approaches to behavior in the mouse. *Science* **264**:1724-1733.

Tavtigian SV, Simard J, Rommens J, Couch F, Shattuck-Eidens D, Neuhausen S, Merajver S, Thorlacius S, Offit K, Stoppa-Lyonnet D, Belanger C, Bell R, Berry S, Bogden R, Chen Q, Davis T, Dumont M, Frye C, Hattier T, Jammulapati S, Janecki T, Jiang P, Kehrer R, Leblanc JF, Goldgar DE. (1996). The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. *Nature Genetics* **12**:333-337.

Thiagalingam S, Foy RL, Cheng KH, Lee HJ, Thiagalingam A, Ponte JF. (2002). Loss of heterozygosity as a predictor to map tumor suppressor genes in cancer: molecular basis of its occurrence. *Current Opinion Oncology* **14**:65-72.

Thomas H, Hanby AM, Smith RA, Hagger P, Patel K, Raikundalia B, Camplejohn RS, Balkwill FR. (1996). An inbred colony of oncogene transgenic mice: diversity of tumours and potential as a therapeutic model. *British Journal of Cancer* **73**:65-72.

- Thompson AM, Morris RG, Wallace M, Wyllie AH, Steel CM, Carter DC.** (1993). Allele loss from 5q21 (APC/MCC) and 18q21 (DCC) and DCC mRNA expression in breast cancer. *British Journal of Cancer* **68**:64-68.
- Tirkkonen M, Johannsson O, Argnarsson BA, Olsson H, Ingvarsson S, Karhu R, Tanner M, Isola J, Barkardottir RB, Borg A, Kallioniemi OP.** (1997). Distinct somatic genetic changes associated with tumor progression in carriers of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutations. *Cancer Research* **57**:1222-1227.
- Tischfield JA.** (1997). Loss of Heterozygosity or: how I learned to stop worrying and love mitotic recombination. *American Journal of Human Genetics* **61**:995-997.
- Tong CY, Ng HK, Pang JC, Hu J, Hui AB, Poon WS.** (2000). Central neurocytomas are genetically distinct from oligodendrogliomas and neuroblastomas. *Histopathology* **37**:160-165.
- Treco D, Arnheim N.** (1986). The evolutionarily conserved repetitive sequence d(TG.AC)n promotes reciprocal exchange and generates unusual recombinant tetrads during yeast meiosis. *Molecular Cell Biology* **6**:3934-3947.
- Tsou HC, Ping XL, Xie XX, Gruener AC, Zhang H, Nini R, Swisshelm K, Sybert V, Diamond TM, Sutphen R, Peacocke M.** (1998). The genetic basis of Cowden's syndrome: three novel mutations in PTEN/MMAC1/TEP1. *Human Genetics* **102**:467-473.
- Twigg SR, Kan R, Babbs C, Bochukova EG, Robertson SP, Wall SA, Morriss-Kay GM, Wilkie AO.** (2004). Mutations of ephrin-B1 (EFNB1), a marker of tissue boundary formation, cause craniofrontonasal syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**:8652-7.
- Ueda K, Nishijima M, Inui H, Watatani M, Yayoi E, Okamura J, Yasutomi M, Nakamura Y, Miyoshi Y.** (1998). Infrequent mutations in the PTEN/MMAC1 gene amount primary breast cancer. *Japanese Journal of Cancer Research* **89**:17-21.
- Valenzuela DM, Rojas E, Griffiths JA, Compton DL, Gisser M, Ip NY, Goldfarb M, Yancopoulos GD.** (1995). Identification of full-length and truncated forms of Ehk-3, a novel member of the Eph receptor tyrosine kinase family. *Oncogene* **10**:1573-1580.
- van de Vijver MJ.** (1993). Molecular genetic changes in human breast cancer. *Advances in Cancer Research* **61**:25-56.
- Van de Vijver, Nusse R.** (1991). The molecular biology of breast cancer. *Biochimica Biophysica Acta* **1072**:33-50.
- van de Vijver MJ, Peterse J, Mooi WJ, Wisman P, Lomans J, Dalesio O, Nusse R.** (1988). NEU-protein overexpression in breast cancer: association with comedo-type ductal carcinoma in situ and limited prognostic value in stage II breast cancer. *The New England Journal of Medicine* **319**:1239-1245.
- van de Vijver MJ, Van de Bersselaar R, Devilee P, Cornelisse C, Peterse J, Nusse R.** (1987). Amplification of the neu (c-erbB-2) oncogene in human mammary tumors is relatively frequent and is often accompanied by amplification of the linked c-erbA oncogene. *Molecular Cell Biology* **7**: 2019-2023.

- Varmus HE.** (1984). The molecular genetics of cellular oncogenes. *Annual Review in Genetic* **18**:553-612.
- Vrieling H.** (2001). Mitotic maneuvers in the light. *Nature Genetics* **28**:101-102.
- Walker-Daniels, J., Coffman, K., Azimi, M., Rhim, J. S., Bostwick, D. G., Snyder, P., Kerns, B. J., Waters, D. J., and Kinch, M. S.** (1999). Overexpression of the EphA2 tyrosine kinase in prostate cancer. *Prostate* **41**: 275-280.
- Wang J, Kataoka H, Suzuki M, Sato N, Nakamura R, Tao H, Maruyama K, Isogaki J, Kanaoka S, Ihara M, Tanaka M, Kanamori M, Nakamura T, Shinmura K, Sugimura H.** (2005). Downregulation of EphA7 by hypermethylation in colorectal cancer. *Oncogene*. [Epub ahead of print]
- Weinberg R.** (1991). Tumor suppressor genes. *Science* **254**:1138-1146.
- Weinberg R.** (1993). Tumor suppressor genes. *Neuron* **11**:191-196.
- Weissenbach J, Gyapay G, Dib C, Vignal A, Morissette J, Millasseau P, Vaysseix G, Lathrop M.** (1992). A second-generation linkage map of the human genome. *Nature* **359**:794-801.
- Wilkinson DG.** (2003). How attraction turns to repulsion. *Nature Cell. Biology* **5**:851-853.
- Wiseman BS, Werb Z.** (2002). Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. *Science* **296**:1046-1049.
- Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, Collins N, Gregory S, Gumbs C, Micklem G.** (1995). Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* **378**:789-792.
- Wu Y, Renard CA, Apiou F, Huerre M, Tiollais P, Dutrillaux B, Buendia MA.** (2002). Recurrent allelic deletions at mouse chromosomes 4 and 14 in Myc-induced liver tumors. *Oncogene* **21**:1518-1526.
- Wunderlich V.** (2002). Chromosomes and cancer: Theodor Boveri's predictions 100 years later. *Journal of Molecular Medicine* **80**:545-548.
- Xu Z, Lai KO, Zhou HM, Lin SC, Ip NY.** (2003). Ephrin-B1 reverse signaling activates JNK through a novel mechanism that is independent of tyrosine phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* **278**:24767-24775.
- Xu X, Wagner KU, Larson D, Weaver Z, Li C, Ried T, Hennighausen L, Wynshaw-Boris A, Deng CX.** (1999). Conditional mutation of Brcal in mammary epithelial cells results in blunted ductal morphogenesis and tumour formation. *Nature Genetics* **22**:37-43.
- Zelinski DP, Zantek ND, Stewart JC, Irizarry AR, Kinch MS.** (2001). EphA2 overexpression causes tumorigenesis of mammary epithelial cells. *Cancer Research* **61**:2301-6.
- Zhu X, Dunn JM, Goddard AD, Squire JA, Becker A, Phillips RA, Gallie BL.** (1992). Mechanisms of loss of heterozygosity in retinoblastoma. *Cytogenetics and Cell Genetics* **59**:248-252.

Zisch A, Kalo MS, Chong LD, Pasquale EB. (1998). Complex formation between EphB2 and Src requires phosphorylation of tyrosine 611 in the EphB2 juxtamembrane region. *Oncogene* **16**:2657-2670.

Zimmer M, Palmer A, Kohler J, Klein R. (2003). EphB-ephrinB bi-directional endocytosis terminates adhesion allowing contact mediated repulsion. *Nature Cell Biology* **5**:869-878.

ANNEXE 1a

La région entourant le gène *EphA10* semble réfractère à l'homozygosité

L'analyse LOH engendre une somme importante d'informations. Ces résultats sont exprimés sur un graphique, affichant les marqueurs microsatellites en abscisse et les tumeurs en ordonné. Sur ce graphique, chaque point de convergence entre une tumeur et un marqueur représente un résultat PCR. Chaque résultat est qualifié (□ hétérozygote, ■ LOH, • homozygote) et quantifié (% de LOH).

L'analyse LOH donne un portrait moléculaire des changements génétiques au sein d'un génome. Les souris MMTV/*neu* démontrent un fort taux d'homozygosité sur le chromosome 4 : 65 des 93 tumeurs provenant des souris hybrides (BALB/c x C57BL/6) MMTV/*neu* possède au moins un marqueur homozygote (•) pour l'allèle C57BL/6 (Figure 4.4, page suivante). Un marqueur est dit "homozygote" lorsqu'il démontre deux allèles de souche C57BL/6 (C57BL/6 x C57BL/6) dans la tumeur et son contrôle. Ce phénomène serait provoqué durant les croisements des souris Tg MMTV/*neu* (consulter l'article Cool, Depault et Jolicoeur et l'annexe 1). Cette homozygosité n'est donc pas spécifique aux tumeurs mais se retrouve dans l'ensemble des cellules de la souris. Ceci explique pourquoi deux tumeurs provenant d'une même souris (1AT-1BT; 18AT-18BT; 81AT-81BT) démontrent des patrons d'homozygosités identiques. La Figure 4.4 montre que 62 tumeurs sont homozygotes (C57BL/6 x C57BL/6) au niveau de la portion distale (de D4Mit276 à D4Mit254) du chromosome 4. A l'inverse, seulement 8 tumeurs sont homozygotes au niveau de la partie proximale (de D4Mit236 à D4Mit176) du chromosome 4. L'homozygosité dans la portion distale du chromosome 4 (en syntenie avec le chromosome 1p humain) peut possiblement prédisposer les souris au développement de tumeurs mammaires. Plusieurs tumeurs sont homozygotes sur une grande partie du chromosome 4. Toutefois, un îlot hétérozygote (lignes pointillées, Figure 4.4) subsiste entre les marqueurs D4Mit332 et D4Mit249 et ce, dans les 93 tumeurs analysées. Aucun des marqueurs de cette région n'est homozygote. Étrangement, cet îlot hétérozygote contient le gène candidat *EphA10*. Les séquences entourant le locus *EphA10* semblent donc réfractères à l'homozygosité de la souche C57BL/6. Si cette région du génome des souris MMTV/*neu* contient un GST muté au niveau de l'allèle C57BL/6 (possiblement *EphA10*), l'homozygosité de cette région pourrait être létale pour l'embryon.

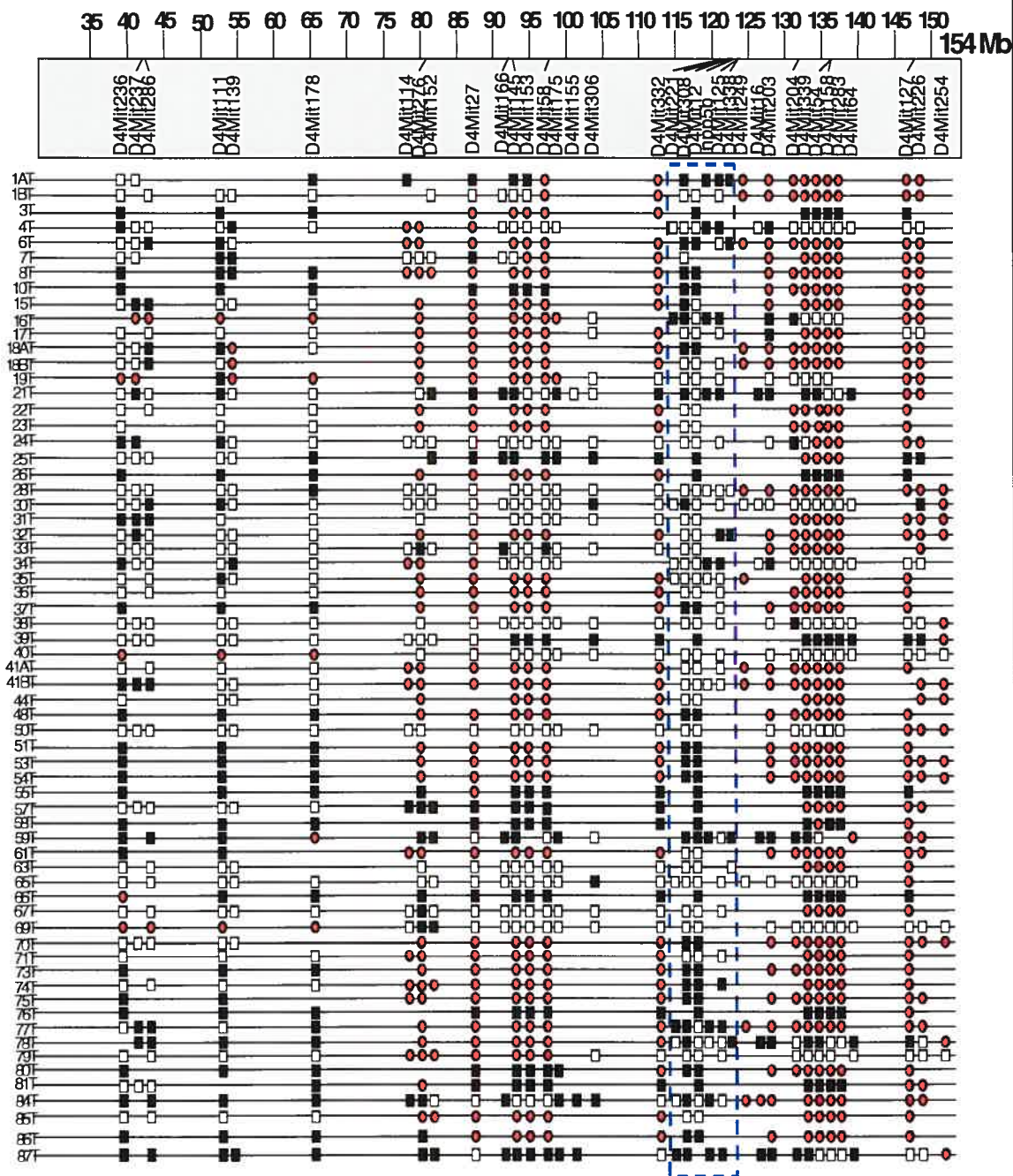


Figure 4.4 Analyse des patrons d'homozygosité sur le chromosome 4 des tumeurs MMTV/*neu*.

Seules les tumeurs MMTV/*neu* démontrant un marqueur homozygote sur le chromosome 4 sont présentées sur cette figure. Les **lignes pointillées** montre le locus invariablement hétérozygote dans les 93 tumeurs MMTV/*neu*

ANNEXE 1

Construction du transgène MMTV/*neu* et croisement des lignées MMTV/*neu* par le laboratoire du Dr Jolicoeur.

Construction du transgène MMTV/*neu*

Le transgène MMTV/*neu* contient l'ADNc muté (Val-664→Glu; région transmembranaire) du gène *neu* sous le contrôle du promoteur MMTV (Figure 1). Une queue poly(A) de provenance virale fut ajoutée au bout 3'. Cet ADN fut inoculé dans les embryons de souris C57BL/6 X C3H F2 pour générer la souris transgénique MMTV/*neu*.

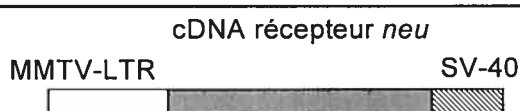


Figure 1. Construction du transgène MMTV/*neu*.

Croisement des lignées MMTV/*neu*

Les souris MMTV/*neu* ont été croisé durant plusieurs générations avec des souris de souche Balb/c (Figure 2). Finalement, les souris MMTV/*neu* Balb/c ont été croisé avec des souris de souche C57BL/6 pour générer les souris hybrides C57BL/6 X Balb/c. Le laboratoire du Dr Jolicoeur a collecté les tumeurs des glandes mammaires des souris femelles en F₁ et isolé l'ADN pour le soumettre à l'analyse LOH. Le laboratoire du Dr Jolicoeur a également isolé l'ADN normal du rein de chaque animal comme contrôle.

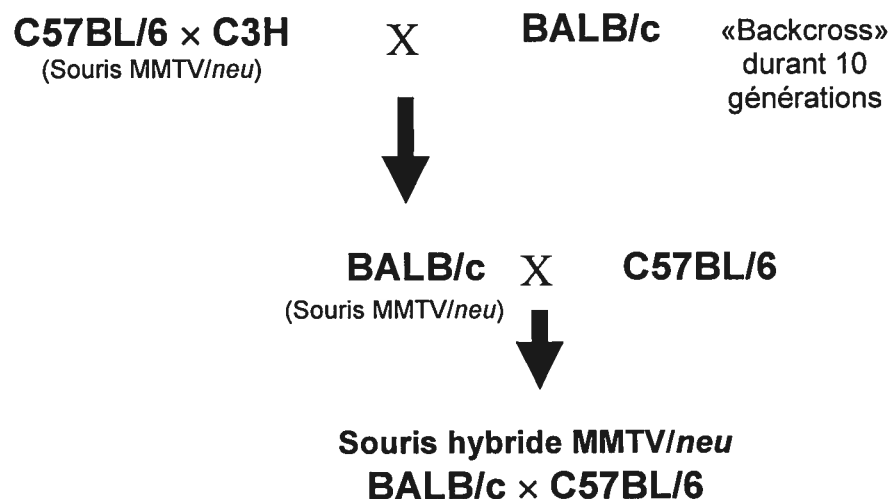


Figure 2. Croisement des lignées MMTV/*neu*.

Annexe 2

Liste des amorces

Les numéros d'amorces sont ceux utilisés par le laboratoire du Dr Jolicoeur. Les amorces des marqueurs microsatellites employés dans les deux articles de cette thèse ne sont pas incluses dans cette liste, bien vouloir consulter le site Web du laboratoire Jackson (<http://www.informatics.jax.org/>).

Tableau II. Amorces pour l'amplification des exons du gène de souris EphA10

Exon	Numéro amorce	Amorce, sens (S) ou anti-sens (AS)	Longueur du fragment amplifié (pb)
1	1641	GCACTGACAGCTCCGTC (S)	187
	1101	CCTCCCCAACTCCCTAATTT (AS)	
2	2305	ATCCCACCCTCCTAGTCTGACAGT (S)	204
	2306	AGTGAACACAGGGTTCTGAAGGGA (AS)	
3a	1505	CCAGTGCTTAAGGCCAGACT (S)	514
	1508	GCGGCACTGCTTGTAGTAGA (AS)	
3b	1639	GGTCTCGGTGCGTGTCTACT (S)	283
	1640	ATGTCCCTATCCCATCCCTC (AS)	
4	1637	ATTTCTCCTCACCAACCCCT (S)	242
	1638	CTCAGTATTTCTGGGTGGC (AS)	
5	2307	ATGAGTCCCTTGGGTCCCT (S)	242
	2308	AATTCCTTGGGATGCTTGCGAGG (AS)	
6	1501	GAGCTTGTGGGCAGAGAGTC (S)	222
	1502	CAGGCTGGGATCTAGGTTGT (AS)	
7	1631	CCCCAATTTAGGGTAGTCC (S)	300
	1632	GCATCCAGAATCTTCCAAGC (AS)	
8	1808	TTTCTCTCTAGTTGCCCA (S)	175
	1807	AGGTTCTGTCACCATGTGCA (AS)	
9 et 10	1820	CGGCTGAGCTTTTCTTTCTG (S)	401
	1821	AGGCTCTTCTCCAGGGTGAC (AS)	
11	2309	TGGGAGTCTGAGATGCCTGTTT (S)	292
	2310	TGCCCACACGAAGGATGTGTAA (AS)	
12	2311	TTTGCTTCTGGCTCTTTGGGCT (S)	306
	2312	ACATCCCTCTGGGATTTGGTGT (AS)	
13	1635	CAGAGGGATGTAGACGCTCC (S)	316
	1636	GAGAGAAACAGCACATGCGA (AS)	
14	1494	GATGAAGCCTGCTGGTGACT (S)	239
	1495	GCTAAGAGGTCAGGGAGCTG (AS)	
15	1503	ATTGGAAGCATCCTGTCTGC (S)	284
	1504	GGTGATAAGTTTGGCTGGCT (AS)	
16	1499	ACCCTGGCTGTTGTCAGACT (S)	255
	1500	CAAGTTGGAAGGGGCTCTCT (AS)	
17	2074	GTCTAGAAAGAGAGCCCCTTCCAATT (S)	336
	1648	GCCCACTAAGGAAGAGCAC (AS)	

Tableau III. Amorces diverses pour l'amplification gènes EphA10/EPHA10

Numéro amorce	Amorce
948	TATGGATCCACTCTCCAGAAA
949	CAAAGTCTCCTCCAAGGCTG
1631	CCCCAATTCAGGGTAGTCC
1632	GCATCCAGAATCTTCCAAGC
1641	GCACTGACAGCTCCGTC
1642	GGCACACACAGAATGTAGAAG
1643	GCCCTGGAGAATGCTTCTAC
1644	TGCACTTCAATGCTTGGAC
1645	GAAGGGTCAGAGTGAGCAG
1646	CACGCCCCAAGCCAGAG
1647	GCCATGAAGTATCTGTCGGAG
1648	GCCCACTAAGGAAGAGCAC
1649	ACCTATGCGCAGGTCACAGT
1650	GTATCGCTGTCGTGGCGAG
1740	GAAGCAGTTCTCCTGGCAAC
1741	GTAAAGCCCTTTCTCGACCC
1808	TTTCCTCTCTAGTTGCCCA
1809	TGTGCGATTAGGATTCTCCC
1818	AATCTCCTCATTTGGGAGGC
1820	CGGCTGAGCTTTTCTTTCTG
1821	AGGCTCTTCTCCAGGGTGAC
1896	GGAGCGACTTTCTTGTCCTG
2072	TAAGCTTCTCCTCATCCTCTGCTGACC
2073	GTCTAGATCAAGCCCCAACACAGAGTA
2074	GTCTAGAAAGAGAGCCCCTTCCAATT
2075	AGAATTTCGGACCACTAGGTCAGCAAGG
2135	AGTCGACTCTGAAGGGACCAAGAGGTG
2136	AGAATTCACGGGTCCCCGCAGCTTT
2137	AGGATCCTGCAGGCTGTGCATCTGTTT
2138	AGCGGCCGCAGGGACCTAGGGAACAGACC
2188	GGTCTGTTCTGCCCTACAGC
2189	CCTCCACAATGACCTTGGAT
2190	CAGACACGAGCAGAGACCTG
2230	CCACTGCTTACTGGCTTATCG

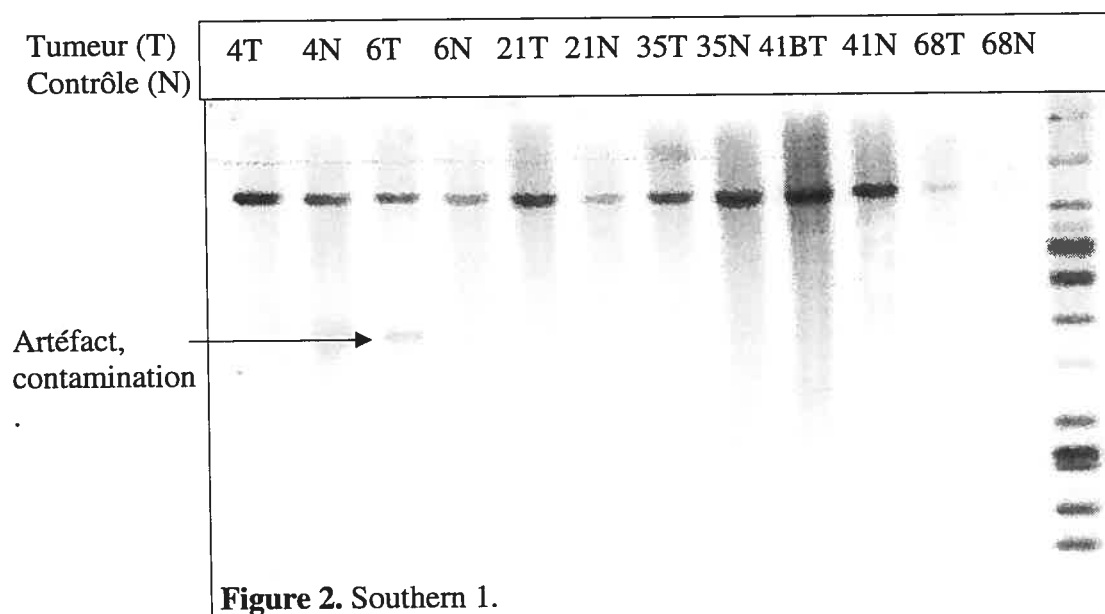
Tableau IV. Amorces pour l'amplification des exons du gène humain EPHA10

Exon	Numéro amorce	Amorce, sens (S) ou anti-sens (AS)	Longueur du fragment amplifié (pb)
2	1680	ACAGGGACTTCACCAAAGGA (S)	223
	1681	CATGAGGAGCTGAGGAGACTG (AS)	
3a	1682	GCCACCCCTTTACTCTTGT (S)	379
	1683	GTGTTCACTTCATCTTGCG (AS)	
3b	1684	ACGAGAGCTTCACGCAGG (S)	422
	1685	TACGCTCTACACTCCCACCC (AS)	
4	1686	GATAAACGCTGCCCTAACCA (S)	312
	1687	CTGGATCAGGCCTTCCTTCT (AS)	
5	1688	CACTGGGGGTGGACAAGAC (S)	441
	1689	GGTGGAGACGGTGACCTG (AS)	
6	1690	CTCTCTAGTCCGGTCCCACA (S)	310
	1691	CTGAAGAACCAGAAGCCCTG (AS)	
7	1692	TCAGCCCACATTCACGTAAG (S)	318
	1693	AGGTCCCTGTCCACTCACAC (AS)	
8	1694	GGAATCCTGCTACAGGGTGA (S)	244
	1695	GACCCACCAGGAGTCACCTA (AS)	
9	1696	GTGCTCTGTAATGGGAAGGG (S)	205
	1697	GGCTCATGCAGTGTAGCAAG (AS)	
10	1698	GCGGTATCTGAGGTGCTGTT (S)	291
	1699	CTCCAAACTCCCACACCATC (AS)	
11	1700	CGGAGTGGAGTGGACAACCTT (S)	200
	1701	CAATTCCAAGCCCTACCAAA (AS)	
12	1702	CAGGGTGAATAAGCCTGG (S)	386
	1703	AAGTGGGGAGTTAAGGGCTC (AS)	
13	1704	GTGTCACCCAGTTCCTCCTT (S)	295
	1705	CTGAGGCAGGAAGATTGAGG (AS)	
14	1706	ACACCATATGCTGGGGAAAC (S)	319
	1707	ACTTGCAACATGCAGGGAG (AS)	
15	1708	TTACCCTCCCCTTCTCCTGT (S)	357
	1709	TTCTCTGGACAGGTTGGGAC (AS)	
16	1710	TCCCAACCTGTCCAGAGAAG (S)	245
	1711	GGAGTCCTGCCTTGGAAGA (AS)	

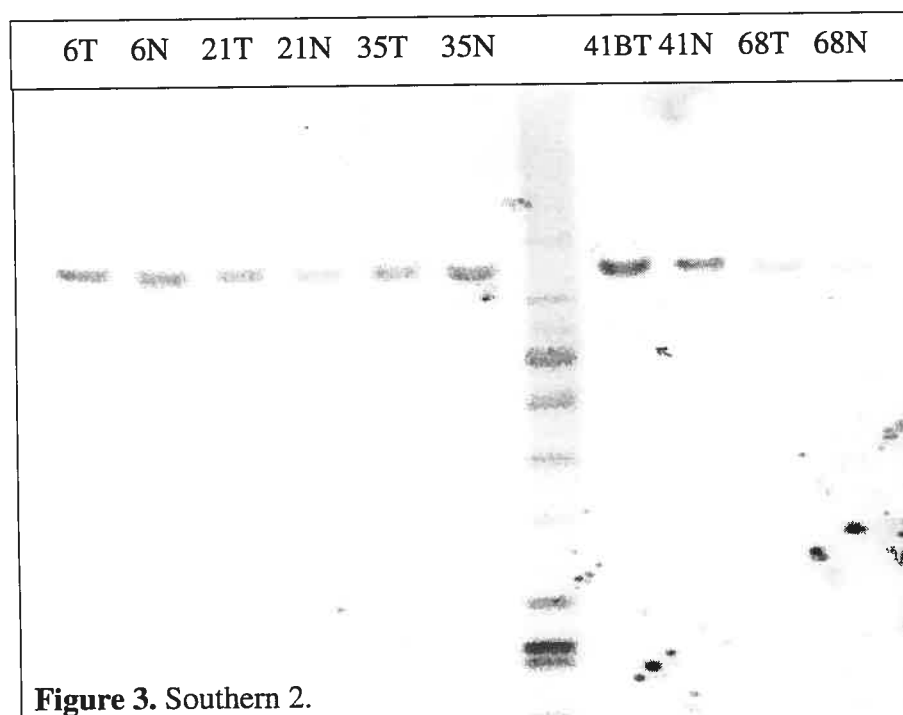
Résultats Southern blot

Tumeurs du locus LOH Naad4-13b : 6T, 35T et 41BT

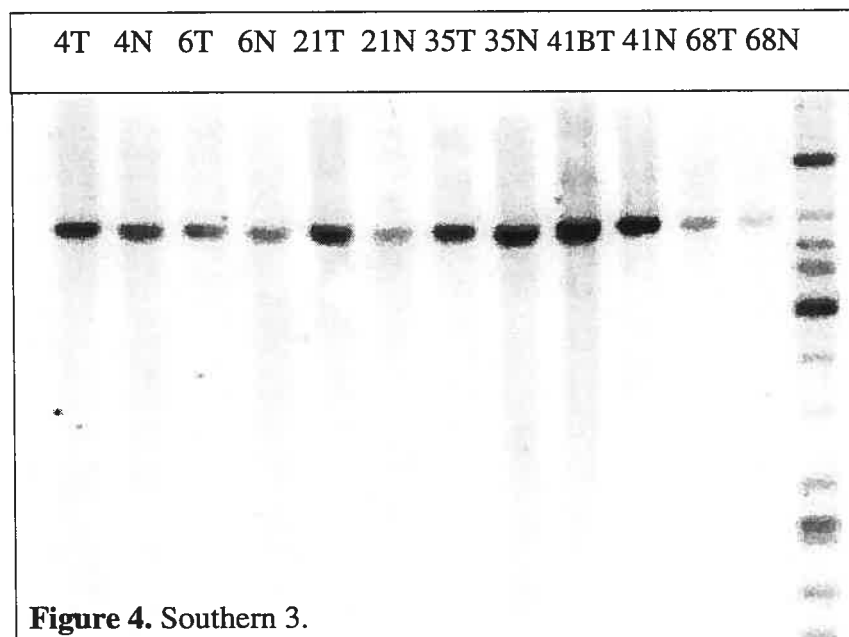
Hybridation de la sonde 1 (amorces : 1740-1741, annexe 2),
digestion du génome avec l'enzyme BamH1



Hybridation de la sonde 2 (amorces : 1631-1632),
digestion du génome avec l'enzyme SacI

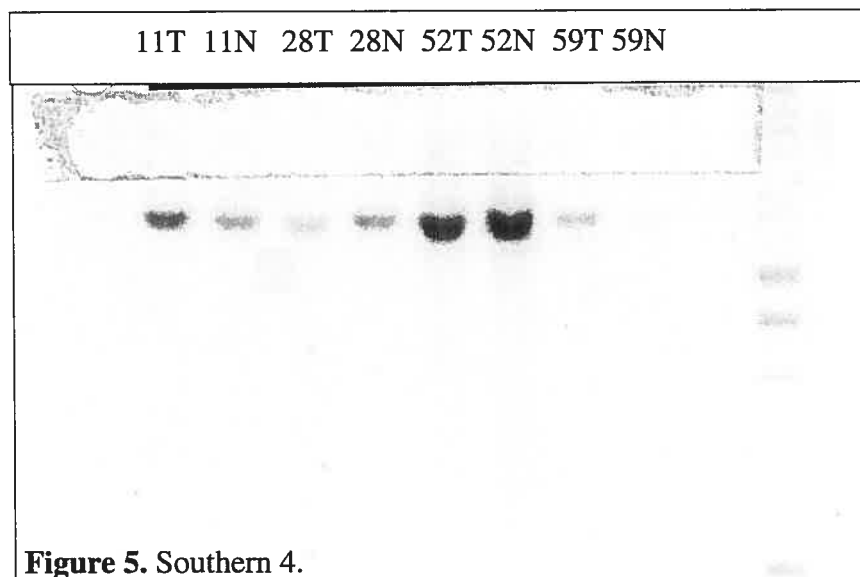


Hybridation de la sonde 3 (amorces : 1808-1809),
digestion du génome avec l'enzyme BamH1

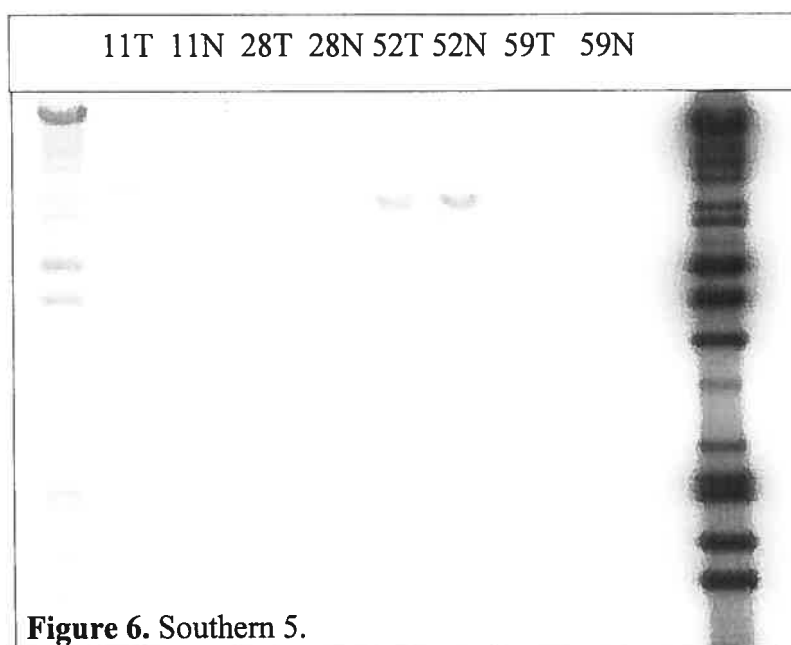


Tumeurs du locus LOH Naad4-13a : 11T, 28T

Hybridation de la sonde 4 (amorces 1820-1821),
digestion du génome avec l'enzyme BamH1



Hybridation de la Sonde 2 (amorces 1820-1821),
digestion du génome avec l'enzyme BamHI



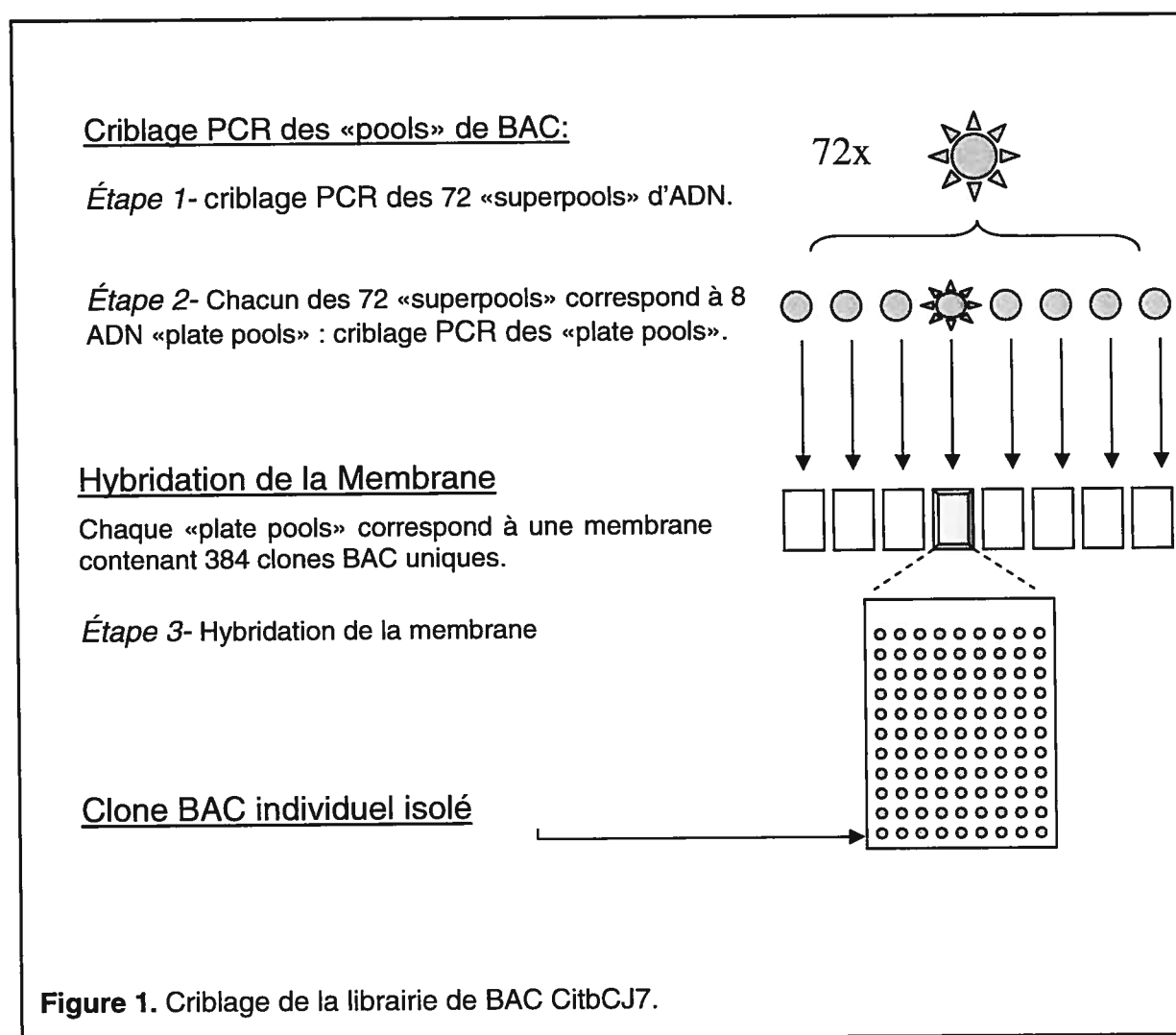
Conclusion : aucun nouveau fragment n'a été détecté dans les Southern blot analysés. De toute évidence, les événements LOH détectés dans les tumeurs de Naad4-13a et Naad4-13b ne semblent pas provoqués par des délétions.

ANNEXE 4

Construction d'un contig BAC couvrant le locus LOH Naad4-13

Criblage de la librairie de BAC CitbCJ7

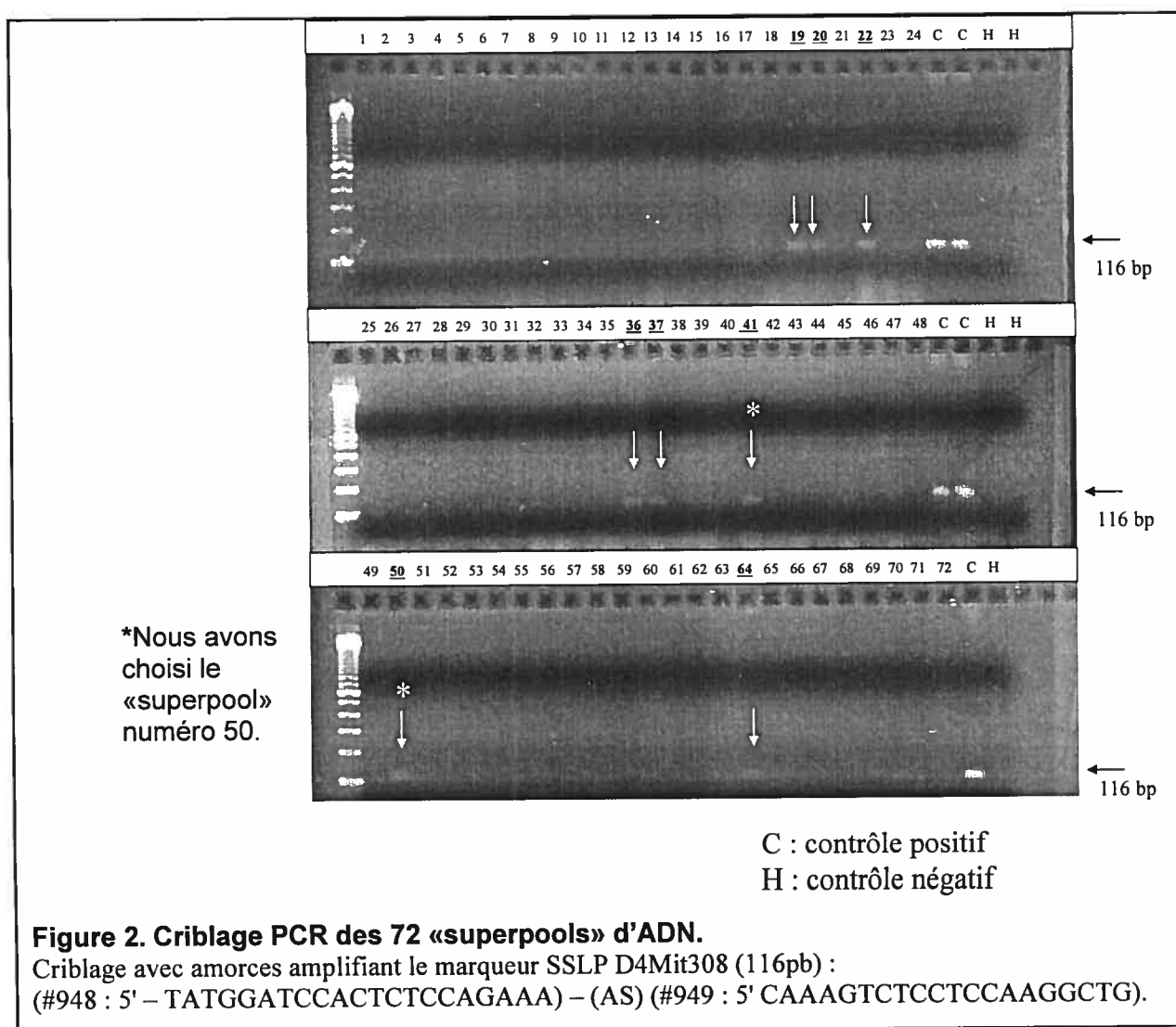
Pour étudier plusieurs Mb d'une région chromosomique, il est important de construire rapidement un contig physique couvrant cette région. Les clones BAC («Bacterial artificial chromosomes») permettent le clonage de grands (>100 kb) fragments d'ADN dans *E. coli*. Ces clones sont faciles à manipuler (contrairement aux YAC) et leurs fréquences de chimérisme est faible (< 5%). La figure 1 illustre les différentes étapes permettant le criblage de la librairie de BAC CitbCJ7 (ES cell line/129Sv, Research Genetics) à l'aide de séquences spécifiques au locus Naad4-13.



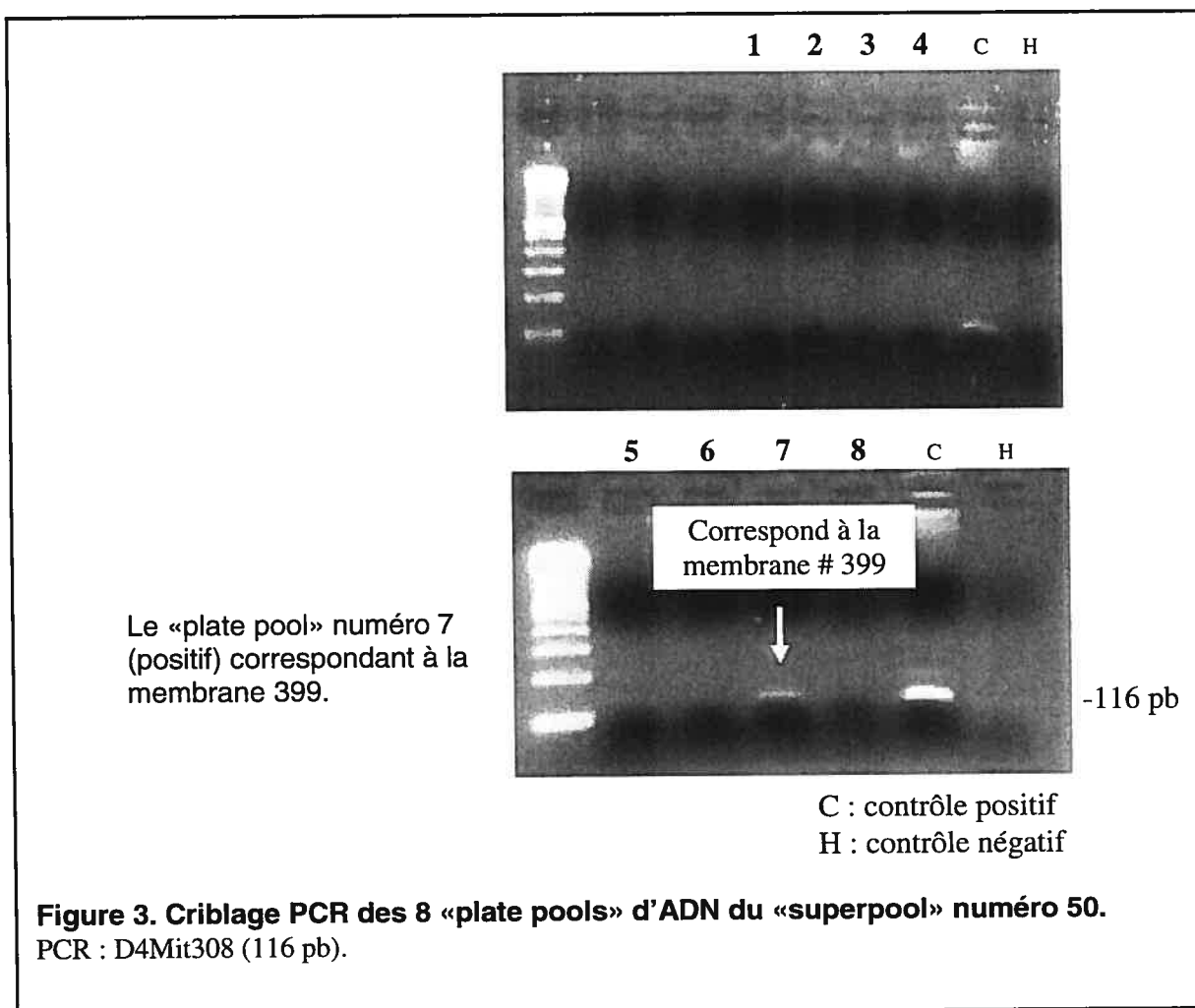
Les 3 figures suivantes décrivent le clonage de deux clones BAC (CITB-399A5 et CITB-399B4) du contig Naad4-13. Ces figures reprennent les 3 étapes schématisées dans la figure précédente.

Le travail réalisé par François Depault et Isabelle Labrosse et schématisé dans les figures (1-4) de l'annexe 4 et dans la figure 3.1 A) de Depault et al. 2006 inclut : la recherche de séquences et la réalisation d'amorces couvrant la région LOH Naad4-13, le criblage de la librairie CITB par PCR (figures 1 à 3 de l'annexe 4) et hybridation des membranes BACs (figure 4 de l'annexe 4), l'identification de tous les BACs CITB de la figure 3.1A, le séquençage des extrémités de plusieurs de ces BACs (T7 et SP6, figure 3.1A) et la réalisation (orientation et position des BACs) de la carte physique du locus Naad4-13 (figure 3.1A).

Étape 1- Criblage PCR des 72 «superpools» d'ADN.



Étape 2- Criblage PCR des 8 «plate pools» d'ADN.



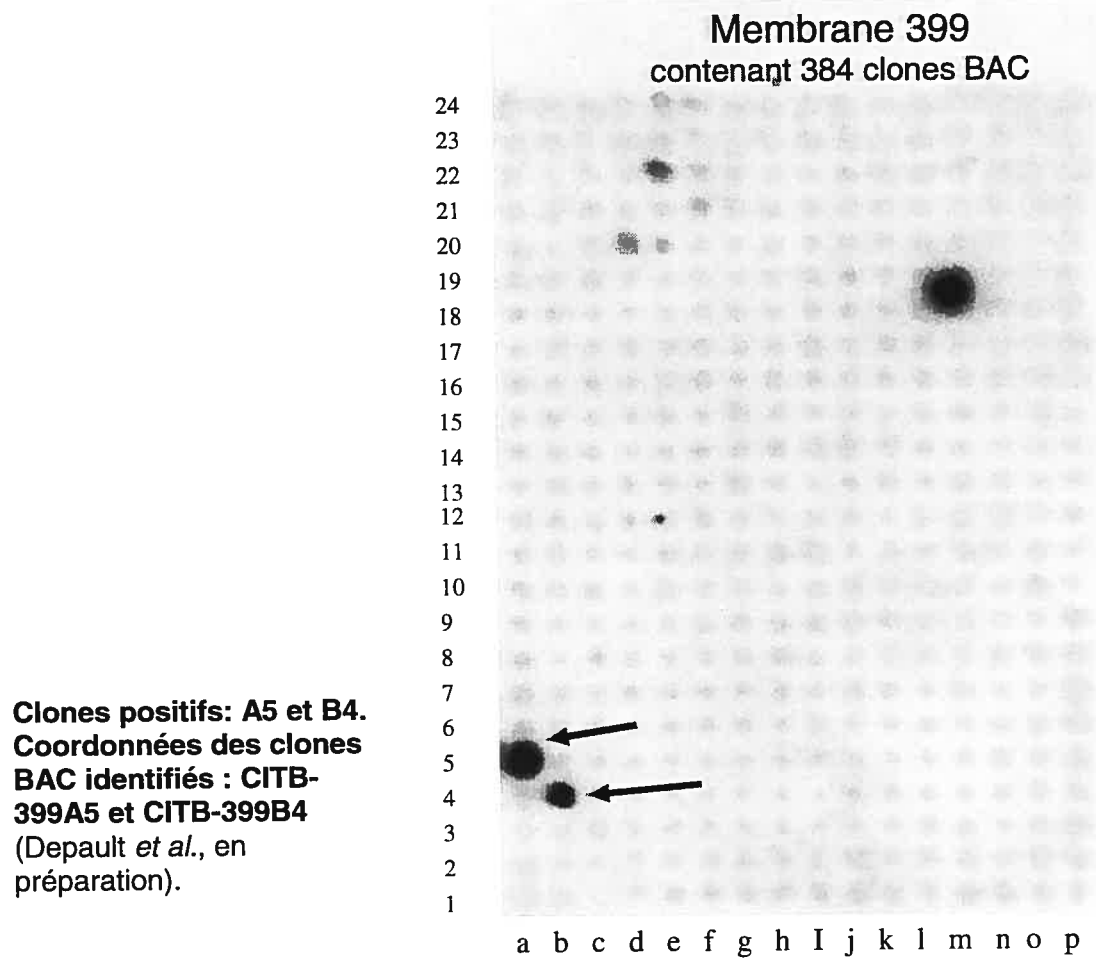


Figure 4. Hybridation de la membrane numéro 399
Hybridation avec amorce # 948.

Description du contig de BAC Naad4-13

François Depault et Isabelle Labrosse ont construit un contig de BAC couvrant le locus LOH Naad4-13 (Depault *et al.* 2006). Nous avons localisé plusieurs marqueurs microsatellites de la région sur différents clones BAC de la librairie CitbCJ7 par PCR (Research Genetics) :

- D4Mit12 a été localisé sur les clones BAC : CITB268I1, -125A12, et -100I2;
- D4Mit147 (EphA10) : CITB159N1;
- D4Mi279 (EphA10) : CITB159N1.
- D4Mit308: CITB399A5, -399B4, - 321G11, -237C9, -560P20.

Nous avons également localisé par PCR d'autres marqueurs STS (*Single Tag Sequence*) du locus Naad4-13 :

- 32.MMHAP11FLC5: CITB399A5, -399B4, -321G11, -237C9;
- 38.MMHAP34FLE5: CITB268I1, -125A12, -100I2, -399A5, -399B4, - 321G11;
- 18.MMHAP82FLF3: CITB268I1, -125A12, -100I2;
- 33.MMHAP36FRC12: CITB517H22, -279L8;
- 34.MMHAP10FRD10 (EphA10): CITB159N1;
- 21.MMHAP61FRG9: CITB159N1.

Les extrémités (T7-SP6) de plusieurs clones BAC ont été séquencés (clones CITB-560P20^{T7-SP6}, -399A5^{T7-SP6}, -268I1^{SP6}, -517H22^{T7}, -159N1^{T7-SP6}). Grâce à ces séquences et à la position des marqueurs cités précédemment, nous sommes en mesure d'échafauder trois contigs BAC (clones BAC chevauchant) : 1) {5' – CITB560P20 – 237C9 – 321G11-399B4 – 399A5 – 180I2 – 125A12 – 268I1 - 3'} ; 2) {5' – CITB517H22 – 279L8 - 3'} ; 3) {5' – CITB159N1 – 415M9 - 3'}. Ces contigs BAC ont été intégrés aux clones BAC disponibles dans les banques de données (NCBI, UCSC).

En résumé, ces clones BAC d'une longueur moyenne de 130 kb (Research Genetics) contiennent plusieurs kb de séquences du locus Naad4-13, notamment les séquences du GST candidat EphA10.

ANNEXE 5A

Analyse LOH du locus Naad4-13, Naad4-13a et Naad4-13b. Figure 3.2 article Depault *et al.* 2006.

Le travail réalisé par François Depault et schématisé dans la figure 3.2 de Depault *et al.* 2006 inclut : la sélection du locus LOH Naad4-13 sur le chromosome 4 (parmi l'ensemble des locis (Naad4-6 à Naad4-16) présentés dans l'article de Cool *et al.* 2006) pour une étude LOH plus approfondie, le choix et la commande des amorces notamment pour l'amplification des marqueurs Inpp5b-D4Mit147-D4Mit279-D4Mit125, l'amplification par PCR de ces marqueurs sur l'ADN des 93 tumeurs MMTV/*neu* ainsi que leurs contrôles, la migration des fragments microsatellites sur gel de polyacrilamide, l'analyse des données avec un logiciel d'analyse d'image, le traitement des résultats par Excel, l'identification des locis LOH Naad4-13, Naad4-13a, Naad4-13b et l'identification du gène EphA10 comme GST candidat.

Identification de la recombinaison du marqueur D4Mit279 (intron 8 du gène EphA10) dans les tumeurs 35T et 41BT. Figure 3.3 article Depault *et al.* 2006.

Le travail réalisé par François Depault et schématisé dans la figure 3.3 de Depault *et al.* 2006 inclut : la réalisation des amorces (1818-1821) et des PCR de 1.2 kb sur les tumeurs 35T et 41BT, le clonage des fragments obtenus, le criblage des clones par enzymes de restriction, l'identification des clones mutants (Mut.1 et Mut.2) par restriction (figure 3.3B), le séquençage des clones mutants (figure 3.3A) et l'identification de l'événement de recombinaison affectant le marqueur D4Mit279 et le gène EphA10.

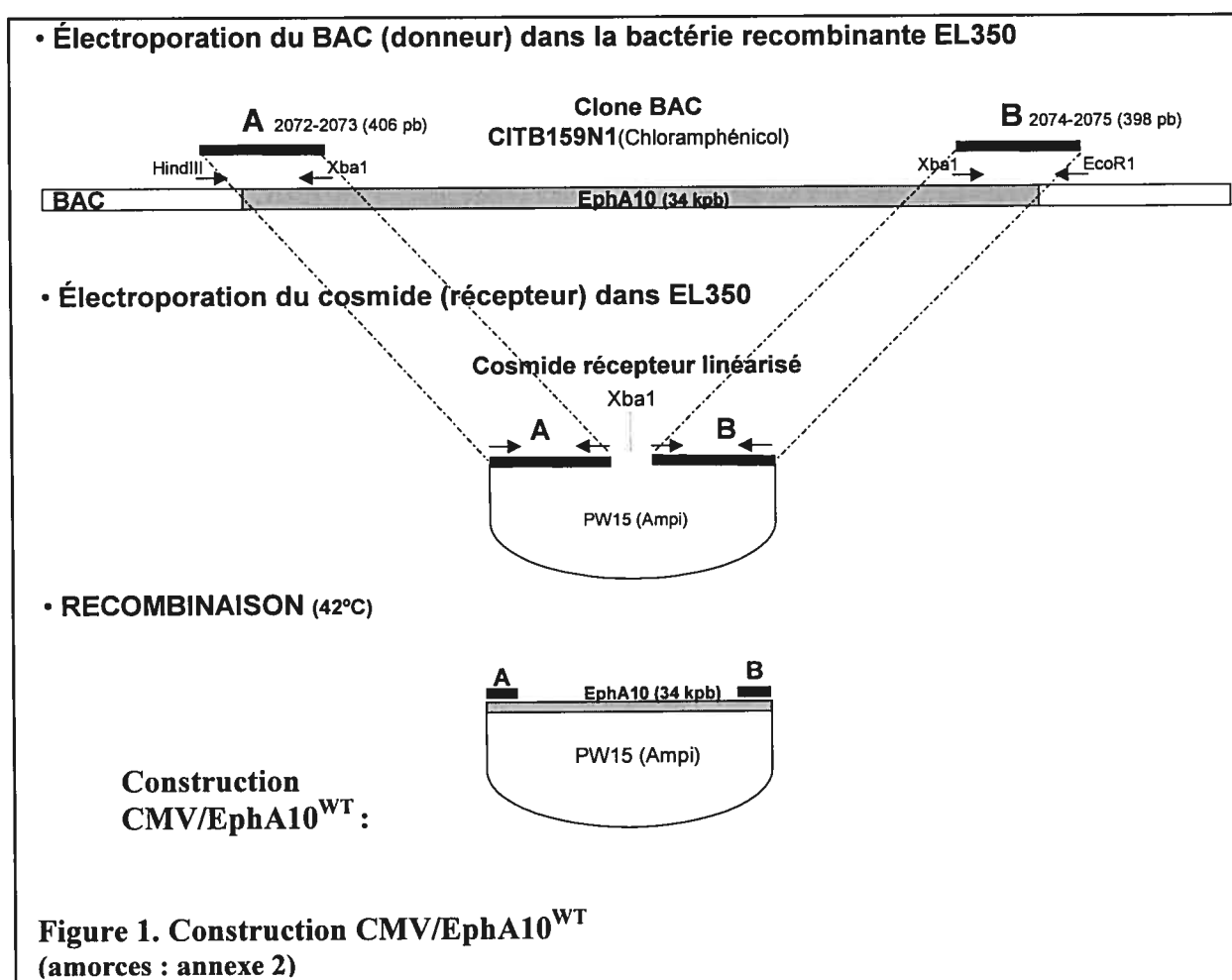
Analyse de l'expression du gène EphA10. Figures 3.4 et 3.5 article Depault *et al.* 2006.

Le travail réalisé par François Depault et schématisé dans les figures 3.4 et 3.5 de Depault *et al.* 2006 inclut : la transfection du cosmide EphA10 full-length (CMV/EphA10^{WT} construit par François Depault et Benoît Laganière, voir annexe 5) dans les cellules 293T, l'isolement de l'ARN des cellules transfectées, la réalisation des RT-PCR avec différentes amorces exoniques réalisées par François Depault (voir annexe 2, Tableaux II et III), le clonage et le séquençage des transcrits (figure 3.4), l'identification de la forme tronquée du gène EphA10 (intron 11) et finalement la réalisation (en partie) du Northern blot de la figure 3.5 (amplification et clonage des sondes 1 et 2, sélection des ARN, préparation de l'échantillon CMV/EphA10^{WT} et identification des fragments de 4.0 et de 2.2 kb). Le Northern blot lui-même a été effectué par Benoît Laganière.

ANNEXE 5

Clonage par recombinaison homologue du gène EphA10 dans un vecteur cosmide (CMV) à partir du clone BAC citb159N1 (Construction CMV/EphA10^{WT})

Les techniques utilisées proviennent de l'article de Liu et al. (2003) intitulé: *A highly efficient recombineering-based method for generating conditional knockout mutations*.



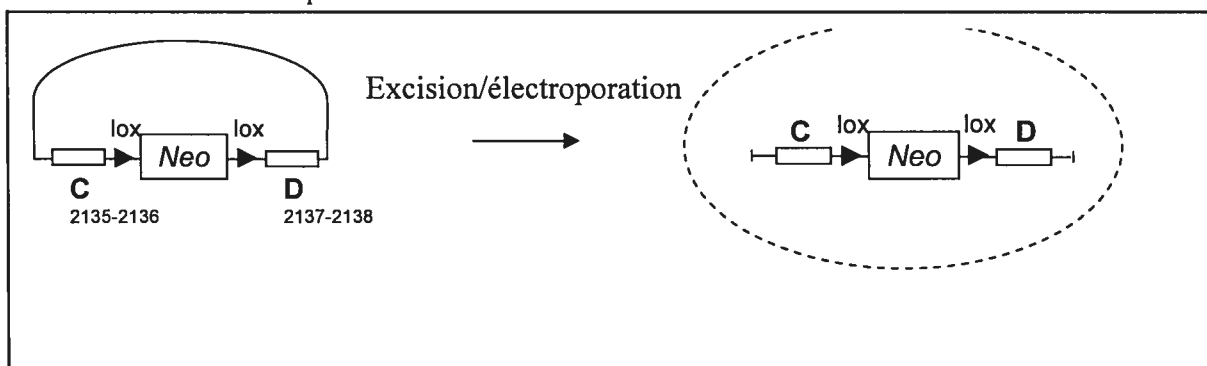
Le travail réalisé par François Depault, schématisé dans la figure 1 de l'annexe 5 et permettant les travaux présentés dans la figure 3.4 de Depault *et al.* 2006 inclut : l'isolement du BAC 159N1 par criblage de la librairie CITB (annexe 4), la réalisation des amorces # 2072-2075 comportant des sites de restriction, le PCR et le clonage des fragments A et B dans le cosmide PW15, la réalisation du protocole de Liu *et al.* incluant la coupure du vecteur récepteur (enzyme Xba1), l'électroporation du cosmide récepteur (PW15) et du BAC 159N1 dans la bactérie EL350. La réalisation de la recombinaison (criblage des pétris positif) fut effectuée par Benoît Laganière.

ANNEXE 6

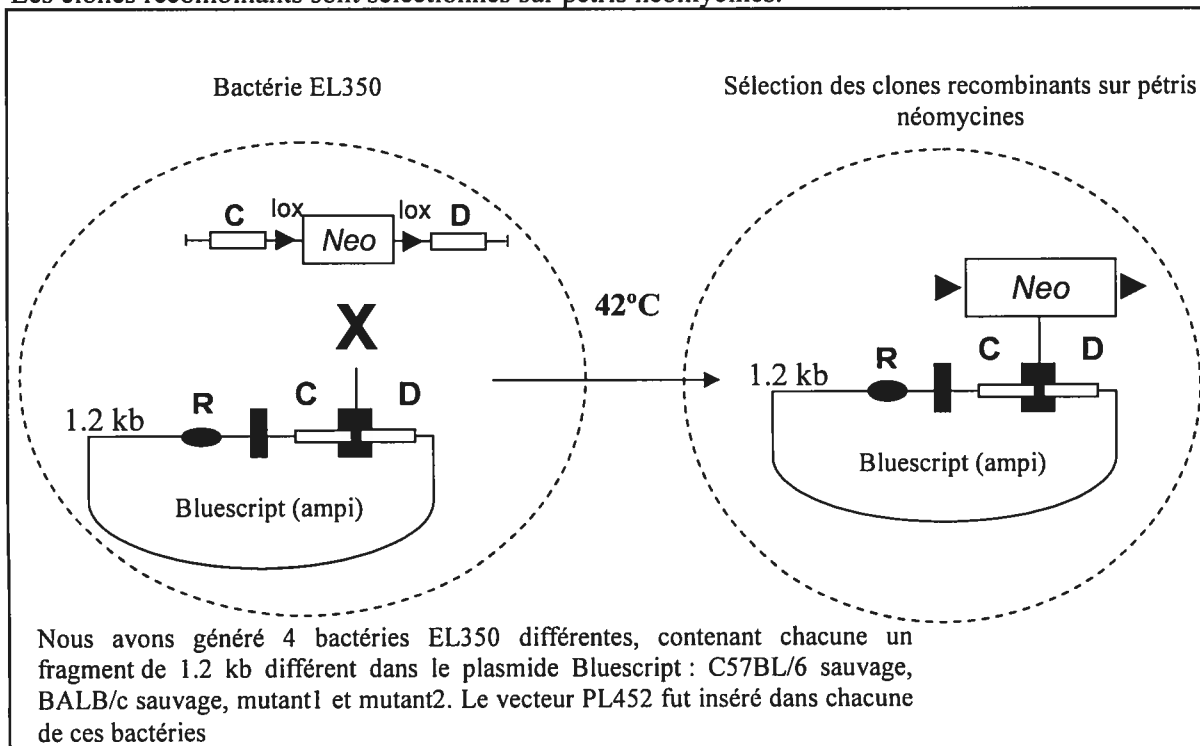
Réintroduction des mutations de l'intron 8 dans le gène EphA10 (Constructions CMV/EphA10^{Mut1} et CMV/EphA10^{Mut2}).

Schématisation de la procédure expérimentale. Les techniques utilisées proviennent de l'article de Liu *et al.* (2003). Amorces : annexe 2. Cette expérience (p165-166) fut effectuée a part égale par Francois Depault et Benoît Laganière

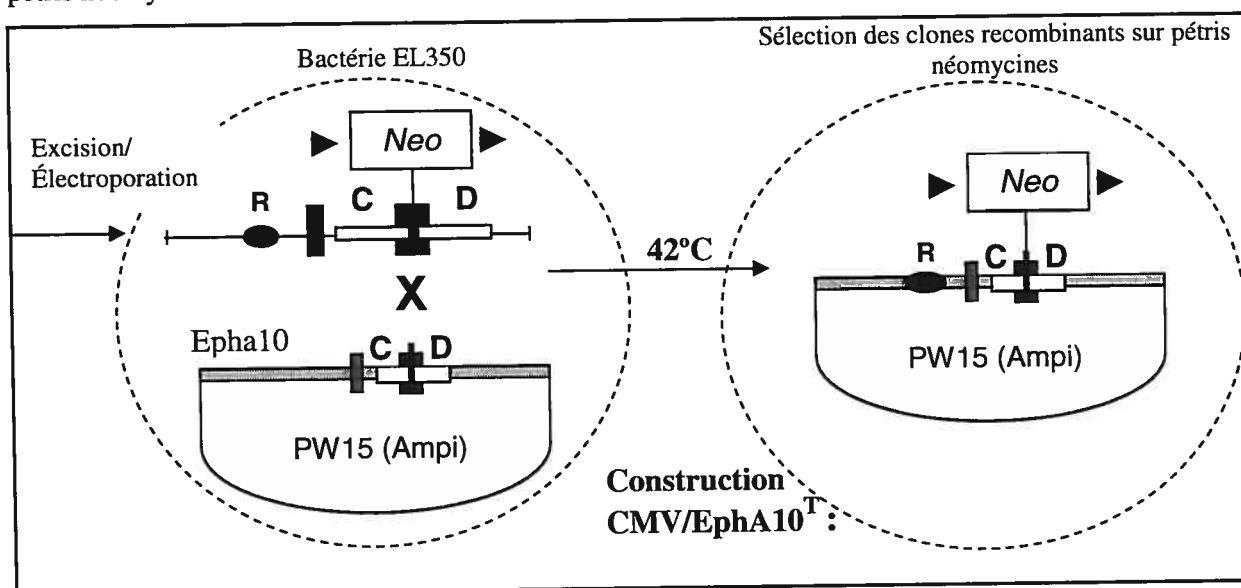
1- Construction d'un vecteur contenant la séquence de sélection *Neo* entourée des cassettes *lox* et de séquences (fragments **C** et **D**) spécifiques à l'exon 10 du gène EphA10. L'insert est excisé du vecteur PL452 et électroporé dans la bactérie recombinante EL350.



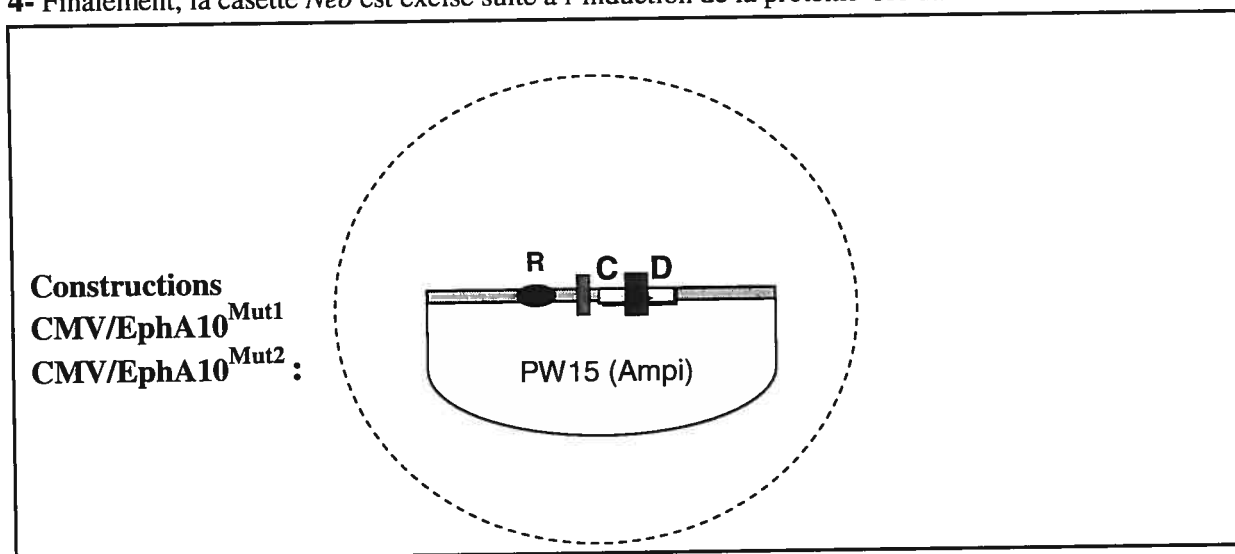
2- La bactérie EL350 contient déjà un plasmide (préalablement électroporé) contenant le fragment génomique de 1.2 kb : intron 8^(905 pb), exon 9^(59 pb), intron 9^(117 pb), exon 10^(98 pb) et une partie de l'intron 11^(20 pb) du gène EphA10. L'intron 8 contient les séquences répétées (**R** : répétition de CA et de poly-T) qui différencient les quatre plasmides : C57BL/6 sauvage, BALB/c sauvage, mutant1 et mutant2. La recombinaison entre les séquences **C** et **D** est induite à 42°C dans la bactérie EL350. Suite à la recombinaison, la séquence *Neo* bordée des cassettes *lox* est insérée au centre de l'exon 10. Les clones recombinants sont sélectionnés sur pétris néomycines.



3- Chaque insert de 1.2 kb (C57BL/6 sauvage, BALB/c sauvage, mutant1 et mutant2) contenant *Neo* est excisé de son plasmide et électroporé dans une bactérie EL350 contenant le fragment génomique (35 kb) complet du gène *Epha10*, inséré dans le cosmide PW15. Les pétris sont incubés à 42°C pour induire la recombinaison entre le fragment linéaire de 1.2 kb et les séquences homologues au sein du gène complet. Les séquences répétées (**R**) ainsi que la cassette *Neo* sont maintenant incorporées au sein de la séquence génomique du gène *EphA10*. Les cosmides recombinés sont ensuite sélectionnés sur pétris néomycines.



4- Finalement, la cassette *Neo* est excisée suite à l'induction de la protéine Cre dans EL350.



François Depault

Maîtrise de l'anglais

FORMATION ACADÉMIQUE**DOCTORAT (PhD) BIOLOGIE MOLÉCULAIRE****2005**

Laboratoire du **Dr Paul Jolicoeur** (M.D. PhD)
Institut de recherches cliniques de Montréal
Université de Montréal

Compétences : cancérologie, génétique, génomique, biologie moléculaire.

- Culture et transfection de cellules
- Northern, Southern, Western blot
- Clonage, enzymes de restriction
- Génotypage (méthodes LOH, SSCP, RFLP)
- PCR, RT-PCR, PCR en temps réel
- Séquençage, logiciels de séquences, banques de données
- Criblage de bibliothèques (BAC)

MAÎTRISE (MSC) CYTOGÉNÉTIQUE**1999**

Laboratoire du **Dr Nicole Lemieux** (PhD)
Faculté de médecine, Université de Montréal
Centre de recherche de l'hôpital Sainte-Justine

Compétences : cytogénétique moléculaire, étude des chromosomes, toxicologie.

- Culture des cellules du sang
- Marquages chromosomiques
- Échanges entre chromatides soeurs
- Microscopie électronique
- Hybridation *in situ*
- Centrifugation par gradient

BACCALAURÉAT (BSC) BIOLOGIE**1998**

Université du Québec à Montréal

PUBLICATIONS

Depault F, Cojocaru M, Fortin F, Chakrabarti S, Lemieux N. (2005). Genotoxic effects of chromium(VI) and cadmium(II) in human blood lymphocytes using the electron microscopy *in situ* end-labeling (EM-ISEL).

Toxicology In Vitro. 2006 Jun;20(4):513-8.

Cool M[†], **Depault F**[†], Jolicoeur P. (2005). Fine allelotyping of mouse chr4 and 19 regions syntenic to human chr 1p and 10q in erbB2-induced mammary tumors reveals multiple discontinuous candidate regions of tumor suppressor loci.

Genes, Chromosomes and Cancer. 2006 Feb;45(2):191-202.

† Ces auteurs ont contribué également à ce travail.

Depault F, Cool M, Hanna Z, Jolicoeur P. EphA is a candidate tumor suppressor gene identified by LOH in murine erbB2-induced mammary tumors and mutated within intronic microsatellite repeats. 2006.

En préparation

PRÉSENTATIONS (exemples représentatifs)

Reasons for hope Canadian breast cancer research initiative 3rd scientific conference

Ottawa, Ontario, october 25-27, 2003.

Candidate new tumor suppressor genes in the MMTV/*neu* transgenic mice.

Depault F, Cool M, and P, Jolicoeur.

Vue panoramique de la recherche sur le cancer

Tremblant, Quebec, mai 9-11, 2005.

Identification d'un nouveau gène suppresseur de tumeurs.

Depault F, Cool M, Hanna Z, and P, Jolicoeur.

HONNEURS

Bourse de la Faculté des études supérieures (2005).

Bourse des Instituts de recherche en santé du Canada (2004).

Mention d'honneur du doyen de la Faculté des études Supérieures et du doyen de la Faculté de médecine pour l'excellence de mes travaux de maîtrise (1999).

FORMATION

Formation en radioprotection, Contex environnement (2004).

